

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

PESQUISA DE ENTEROTOXINAS EM ISOLADOS ALIMENTARES DO GRUPO *Bacillus cereus*

INES LAVADO GOMES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Cristina Vilela

Doutor António Salvador Barreto

ORIENTADOR

Major Veterinário António Lopes João

CO-ORIENTADOR

Doutora Maria João Fraqueza

2009

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

PESQUISA DE ENTEROTOXINAS EM ISOLADOS ALIMENTARES DO GRUPO *Bacillus cereus*

INES LAVADO GOMES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Cristina Vilela

Doutor António Salvador Barreto

ORIENTADOR

Major Veterinário António Lopes João

CO-ORIENTADOR

Doutora Maria João Fraqueza

2009

LISBOA

Agradecimentos

Gostaria de manifestar os meus sinceros agradecimentos às seguintes pessoas:

À Engenheira Anabela Galindro; à Doutora Verónica Ribeiro, ao Sargente-Chefe Marono, ao Sargento-Mor Barbosa, ao Tenente Carlos Alonso, ao Tenente Wilson Antunes, ao Tenente Pedro Silva, ao Capitão José Freitas, ao Capitão Júlio Carvalho, ao Major António Lopes João e ao Coronel Penha Gonçalves pela forma como me receberam no LBDBE.

Ao Major Lopes João por me transmitir o seu conhecimento durante o estágio e por me auxiliar na elaboração desta tese.

Ao Tenente Wilson Antunes e ao Tenente Carlos Alonso, pela ajuda que me deram durante todo o estágio e na elaboração desta tese.

Ao Coronel Penha Gonçalves por me pôr novamente a pensar e por me abrir novos horizontes.

À Professora Maria João Fraqueza pelo seu apoio e conselhos.

À Professora Ana Duarte pela sua ajuda e tempo dispensado.

À minha grande amiga e colega de curso Ana Santos, por me ter apoiado durante todo o curso e estágio e por me fazer sempre acreditar “ser capaz”.

Aos meus pais, à minha avó e ao meu namorado, por me terem apoiado durante todo o curso e por estarem sempre presentes.

Resumo

Os microrganismos do grupo *Bacillus cereus* são causadores de patologia gastrointestinal, podendo ocorrer duas formas da doença: a síndrome diarreica e a síndrome emética. A forma diarreica é causada pela presença de enterotoxinas. São várias as enterotoxinas produzidas por *B. cereus*. Existem duas toxinas tripartidas, a hemolisina BL (HBL) e a enterotoxina não hemolítica (NHE), a citotoxina K (CytK), a enterotoxina T e a enterotoxina FM. Este estudo consistiu na pesquisa de genes que codificam enterotoxinas, por PCR (reação de polimerase em cadeia) em tempo real, em 76 isolados alimentares, provenientes da coleção de bactérias do Laboratório de Bromatologia e Defesa Biológica do Exército. As bactérias utilizadas neste estudo foram caracterizadas morfológicamente, através do isolamento em MYP e agar sangue, e bioquimicamente utilizando a galeria API 50 CH®. Das 76 estirpes analisadas 28 revelaram-se positivas para a toxina HBL, 27 para a NHE, 43 para a enterotoxina T e nenhuma estirpe foi positiva para a citotoxina K. Em suma, 58 das 76 estirpes de *B. cereus sensu lato* utilizadas neste trabalho são potencialmente patogénicas. Os resultados obtidos demonstraram a existência de uma grande variabilidade de estirpes *B. cereus* potencialmente produtoras de enterotoxinas isoladas de alimentos.

Palavras-chave: *Bacillus cereus*; Hemolisina BL; Enterotoxina não hemolítica (NHE); Citotoxina K (CytK); Enterotoxina T (BceT)

Abstract

Many strains of *Bacillus cereus* group cause gastrointestinal diseases, which include two types: diarrheal and emetic syndromes. The diarrheal type of disease is attributed to enterotoxins. Many enterotoxins are produced by *B. cereus*. The enterotoxins include two tri-partied toxins, hemolysin BL (HBL) and nonhemolytic enterotoxin (NHE), cytotoxin K, enterotoxin T and finally enterotoxin FM. The primary objective of this study was the detection of gene enterotoxins, by real-time PCR (polimerase chain reaction), produced by 76 strains isolated from food samples. Those strains were included in a bacterial collection from LBDBE. The strains used in this study were characterized based on morphological data, like the presence or absence of haemolysis, and biochemical information, using the test API 50 CH[®]. 28 strains were positive for toxin HBL, 27 for NHE and 43 were positive to enterotoxin T. None of the strains were positive to cytotoxin K. The results showed a high variability in potencial enterotoxic *B. cereus* strains isolated from food.

Keywords: *Bacillus cereus*; Hemolysin BL; Nonhemolytic enterotoxin (NHE); Citotoxin K (CytK); Enterotoxin T (BceT)

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Lista de abreviaturas	vii
I. Introdução.....	1
II. <i>Bacillus cereus</i>	3
1. Taxonomia	3
2. Características microbiológicas	7
3. Patogénese.....	10
3.1. Factores de Virulência	10
3.2. Patologia.....	12
3.3. Epidemiologia	14
4. Enterotoxinas de <i>Bacillus cereus</i> sensu stricto	16
4.1. Enterotoxina Hemolítica BL (HBL).....	16
4.2. Enterotoxina não-hemolítica (NHE)	19
4.3. Citotoxina K (CytK)	21
4.4. Enterotoxina T (BceT).....	22
4.5. Enterotoxina FM	22
4.6. Regulação da expressão das enterotoxinas.....	23
4.7. Mecanismo de acção das enterotoxinas.....	24
5. Metodologias para pesquisa de enterotoxinas de <i>B. cereus</i>	25
III. Pesquisa de enterotoxinas em isolados do grupo <i>Bacillus cereus</i>	28
1. Material e métodos	28
1.1. Selecção das estirpes.....	28
1.2. Extracção e Purificação de ADN.....	29
1.3. Confirmação da presença de ADN	30
1.4. PCR em tempo real	30
1.5. Electroforese de ADN em gel	32
1.6. Alinhamento das sequências nucleotídicas	33
IV. Resultados	34
1. Caracterização dos isolados do grupo <i>B. cereus</i> em estudo	34
2. Pesquisa de enterotoxinas em isolados do grupo <i>B. cereus</i>	38
2.2. Pesquisa do gene <i>hblA</i>	38
2.2. Pesquisa do gene <i>hblB</i>	40
2.3. Pesquisa do gene <i>hblC</i>	40
2.4. Pesquisa do gene <i>hblD</i>	42
2.5. Pesquisa do gene <i>nheA</i>	44
2.6. Pesquisa do gene <i>nheB</i>	46
2.7. Pesquisa do gene <i>nheC</i>	48
2.8. Pesquisa do gene <i>cytK</i>	50
2.9. Pesquisa do gene <i>bceT</i>	50
2.10. Electroforese de ADN em gel	54
2.11. Alinhamento das sequências nucleotídicas	57
2.12. Resultados da pesquisa dos genes que codificam as enterotoxinas de <i>B. cereus</i>	59
V. Discussão.....	64
VI. Conclusões.....	70
VII. Bibliografia.....	72
Anexo 1 – Origem das estirpes em estudo.....	78
Anexo 2 – Alinhamento das sequências nucleotídicas.....	80

Índice de figuras

Figura 1 – Desenvolvimento taxonómico de <i>B. cereus sensu lato</i> .	5
Figura 2 – Microscopia de contraste de fase de <i>B. cereus</i> evidenciando os esporos (indicado pela seta)	7
Figura 3 – Reacção de hemólise da enterotoxinas HBL. Legenda: H, zona de hemólise.	18
Figura 4 – Organização do operão <i>hbl</i> .	19
Figura 5 – Operão <i>nheABC</i> .	20
Figura 6 – Possível mecanismo de acção da enterotoxina HBL.	25
Figura 7 – Teste Duopath® <i>Cereus</i> Enterotoxins.	26
Figura 8 – Distribuição das estirpes isoladas pelas espécies do grupo <i>B. cereus</i> .	37
Figura 9 – Hemólise das estirpes do grupo <i>B. cereus</i> .	37
Figura 10 – Curvas de amplificação das estirpes J248, J249, J321-J327, controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	38
Figura 11 – Curvas de <i>melting</i> das estirpes J248, J249, J321-J327, controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	39
Figura 12 – Curvas de <i>melting</i> das estirpes J251, J252, J254, J255.	40
Figura 13 – Curvas de amplificação das estirpes J248, J249, J321-J327, controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	40
Figura 14 – Curvas de <i>melting</i> das estirpes J248, J249, J321-J327, controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	41
Figura 15 – Curvas de <i>melting</i> das estirpes J273, J280, J293, J294.	42
Figura 16 – Curvas de amplificação das estirpes J248, J249, J321-J327, controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	42
Figura 17 – Curvas de <i>melting</i> das estirpes J248, J249, J321-J327, controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	43
Figura 18 – Curvas de amplificação das estirpes J281, J290, J293, J302, J310, J248, J249, J321-J328, controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	44
Figura 19 – Curvas de <i>melting</i> das estirpes J281, J290, J293, J302, J310, J248, J249, J321-J328 e controlos positivo, negativo e branco.	44
Figura 20 – Curvas de amplificação das estirpes J248, J249, J321-J327 e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	46
Figura 21 – Curvas de <i>melting</i> das estirpes J248, J249, J321-J327 e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	46
Figura 22 – Curvas de amplificação das estirpes J257, J258, J262, J308, J310, J248, J249, J321-J327 e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	48
Figura 23 – Curvas de <i>melting</i> das estirpes J257, J258, J262, J308, J310, J248, J249, J321-J327 e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	48
Figura 24 – Curvas de amplificação das estirpes J248, J249, J321-J327, J250, J256, J258, J266 e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	50
Figura 25 – Curvas de <i>melting</i> das estirpes J248, J249, J321-J327, J250, J256, J258, J266 e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	50
Figura 26 – Curvas de <i>melting</i> das estirpes J4, J240, J241, J242, J243.	51
Figura 27 – Resultado da electroforese em gel para os genes <i>hblA</i> (amostras a branco) e <i>nheB</i> (amostras a verde).	55
Figura 28 – Resultado da electroforese em gel para os genes <i>hblC</i> (amostras a branco), <i>hblD</i> (amostras a verde) e <i>bceT</i> (amostras a rosa).	56
Figura 29 – Resultado da electroforese em gel para os genes <i>nheA</i> (amostras a branco), <i>nheB</i> (amostras a verde) e <i>nheC</i> (amostras a rosa).	57

Figura 30 – Gráfico que ilustra a distribuição das várias enterotoxinas pelos alimentos analisados.....	63
---	----

Índice de Tabelas

Tabela 1 – ARNr 16S de grupos de microrganismos.	4
Tabela 2 – Características fenotípicas do grupo <i>Bacillus cereus</i>	9
Tabela 3 – Incidência de surtos de toxinfecção alimentar por toxinas na Europa, em 2006.....	15
Tabela 4 – Propriedades físicas dos três componentes da enterotoxina HBL	17
Tabela 5 – Propriedades físicas da enterotoxina não-hemolítica.	19
Tabela 6 – <i>Primers</i> utilizados na pesquisa de enterotoxinas <i>B. cereus</i>	31
Tabela 7 – Resultados da caracterização das estirpes utilizadas neste estudo.	34
Tabela 8 – Temperaturas de <i>melting</i> das estirpes amplificadas e controlos positivo, negativo e branco.	39
Tabela 9 – Temperaturas de <i>melting</i> das estirpes amplificadas e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	41
Tabela 10 – Temperaturas de <i>melting</i> das estirpes amplificadas e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	43
Tabela 11 – Temperaturas de <i>melting</i> das estirpes amplificadas e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	45
Tabela 12 – Temperaturas de <i>melting</i> das estirpes amplificadas e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	47
Tabela 13 – Temperaturas de <i>melting</i> das estirpes amplificadas e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	49
Tabela 14 – Temperaturas de <i>melting</i> das estirpes amplificadas e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.	51
Tabela 15 – Resultado do PCR em tempo real para as 75 estirpes analisadas.	52
Tabela 16 – Estudo da variabilidade dos genes que codificam as enterotoxinas.	58
Tabela 17 – Resultados da pesquisa de enterotoxinas de <i>B. cereus</i> em 75 estirpes de origem alimentar.	59
Tabela 18 – Resultados da pesquisa da enterotoxina HBL.....	61
Tabela 19 – Resultado da pesquisa da enterotoxina não-hemolítica.	61
Tabela 20 – Resultado da pesquisa da enterotoxina T.	61
Tabela 21 – Número de estirpes portadoras dos genes que codificam enterotoxinas.	62
Tabela 22 – Distribuição das estirpes potencialmente patogénicas por tipo de alimento.	63

Lista de abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ADNr – Ácido Desoxirribonucleico ribossomal

ARNm – Ácido Ribonucleico mensageiro

ADNr – Ácido Ribonucleico ribossomal

BceT – *Bacillus cereus* enterotoxina T

CytK – Citotoxina K

EFSA – European Food Safety Authority

GC – Guanina+Citosina

HL – Enterotoxina hemolítica BL

ISO – *International Organization for Standardization*

LBDBE – Laboratório de Bromatologia e Defesa Biológica do Exército

MEE – Electroforese enzimática multilocus (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*)

MMP – Metaloproteinase

MYP – *Mannitol Egg Yolk Polymyxin*

NHE – Enterotoxina não-hemolítica

ORF – Grelha de leitura aberta (*Open Reading Frame*)

Pb – Par de bases

PCA – *Plate Count Agar*

PI – Ponto Isolelétrico

RPM – Rotações por minuto

TIA – Toxinfecção alimentar

I. Introdução

A preocupação e os cuidados com a higiene e segurança alimentar têm vindo progressivamente a aumentar nos últimos anos, uma vez que as doenças transmitidas pela água e alimentos são uma causa importante de morbilidade e mortalidade a nível mundial. Em países como a Finlândia e a Alemanha tem-se vindo a assistir nos últimos anos à implantação de *Bacillus cereus*, substituindo *Salmonella* sp. e *Campylobacter* sp. como principais microrganismos patogénicos alimentares (Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2008; Jääskeläinen, 2008).

B. cereus é uma bactéria formadora de endosporos e é causa comum de toxinfecção alimentar em vários países. Sendo uma bactéria ambiental ubiquitária, é um contaminante comum de matérias-primas e alimentos. No entanto, ao contrário da maior parte dos microrganismos patogénicos alimentares, este agente resiste à maior parte dos tratamentos dos alimentos, tais como a refrigeração, congelação, aquecimento e mesmo à desidratação e radiação. Este facto deve-se à sua capacidade de produzir esporos termorresistentes (Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2008; Jääskeläinen, 2008).

Este agente microbiano pode causar toxinfecção por colonização do intestino delgado com produção de enterotoxinas e subsequente síndrome diarreica, ou pela produção de cereulida nos alimentos, a qual causa a síndrome emética. A síndrome diarreica pode ser o resultado da acção de três enterotoxinas diferentes: a enterotoxina hemolítica BL, enterotoxina não-hemolítica e citotoxina K. Existem ainda outras duas enterotoxinas documentadas, a enterotoxina T e FM, mas até à data ainda não foram isoladas de nenhum caso de toxinfecção alimentar.

Apesar da toxinfecção alimentar provocada por estas enterotoxinas ser geralmente auto-limitante, podem ocorrer casos mais graves da doença, associada a enterite necrótica e diarreia sanguinolenta. Por outro lado, a síndrome diarreica ocorre, na maioria dos casos, pela ingestão de alimentos contaminados com esporos de *B. cereus* que, por serem resistentes a condições extremas, atingem facilmente o intestino delgado, onde germinam, crescem e produzem enterotoxinas.

Perante a escassez de informação sobre a importância da síndrome diarreica por *B. cereus* em Portugal, realizou-se este trabalho que tem como objectivo a pesquisa dos genes que codificam as enterotoxinas numa amostragem da colecção de bactérias do grupo *B. cereus* do Laboratório de Bromatologia e Defesa Biológica do Exército. Esta colecção é composta por isolados obtidos a partir de diversos alimentos analisados no LBDBE. Neste trabalho os microrganismos do grupo *B. cereus* foram classificados até ao nível de espécie com base em características fenotípicas e no perfil bioquímico. A presença dos genes que codificam

as enterotoxinas numa determinada estirpe indica que essa mesma estirpe tem a informação genética necessária para a produção da toxina, sendo por isso potencialmente patogénica.

II. *Bacillus cereus*

1. Taxonomia

A classificação taxonómica dos microrganismos assenta em características clássicas (morfologia, fisiologia, metabolismo e características ecológicas) e em características moleculares (composição de ácidos nucleicos, estudos de hibridação e sequenciação de ácidos nucleicos, sequenciação de aminoácidos) (Prescott, Harley & Klein, 2008).

Inicialmente a classificação bacteriana baseava-se em critérios morfológicos e bioquímicos. Na década de 1970 surgiram técnicas de biologia molecular que começaram então a ser utilizadas para a classificação; o método padrão utilizado inicialmente consistia na hibridação ADN-ADN do genoma completo dos microrganismos, sendo necessário um mínimo de 70% de hibridação entre genomas para considerar duas bactérias como pertencentes à mesma espécie. Actualmente, para além da hibridação ADN-ADN, utiliza-se como critério de classificação taxonómica bacteriana a variação de nucleótidos no ADN ribossomal (ADNr) 16S. Uma divergência nucleotídica de 3% entre duas bactérias é suficiente para as considerar como espécies diferentes (Vilas-Bôas, Peruca & Arantes, 2007).

A análise comparativa das sequências de ARNr 16S (que entram na constituição da subunidade pequena dos ribossomas, a subunidade 30S) é realizada não só por esta molécula desempenhar a mesma função em todos os microrganismos, mas também porque os genes que codificam as subunidades de ARNr não sofrem grandes mutações e por isso não apresentam grande variabilidade, nem ao longo do tempo nem com a reprodução dos microrganismos. A análise comparativa das sequências de ARNr 16S realizada em vários microrganismos demonstra a presença de sequências de oligonucleótidos característicos. Estas sequências são curtas e específicas para cada grupo de bactérias (Prescott *et al.*, 2008). A Tabela 1 mostra as sequências ARNr 16S de grupos de microrganismos, de onde se destacam as bactérias gram positivas de baixa percentagem molecular G+C (guanina+citosina), que incluem os microrganismos do grupo *Bacillus cereus*.

Tabela 1 – ARNr 16S de grupos de microrganismos.

Posição no ARNr	Composição da sequência Consenso	γ - Proteobacteria	Cianobactéria	Espiroquetas	Bacteroides	Deinococcus	Gram-positivos (baixo GC)	Gram positivos (alto GC)	Planctomyces
47	C	+	+	U	+	+	+	+	G
53	A	+	+	G	+	+	+	+	G
570	G	+	+	+	U	+	+	+	U
812	G	c	+	+	+	C	+	+	+
906	G	Ag	+	+	+	+	+	A	+
955	U	+	+	+	+	+	+	AC	C
1207	G	+	C	+	+	+	C	C	+
1234	C	+	+	A	U	+	+	+	+

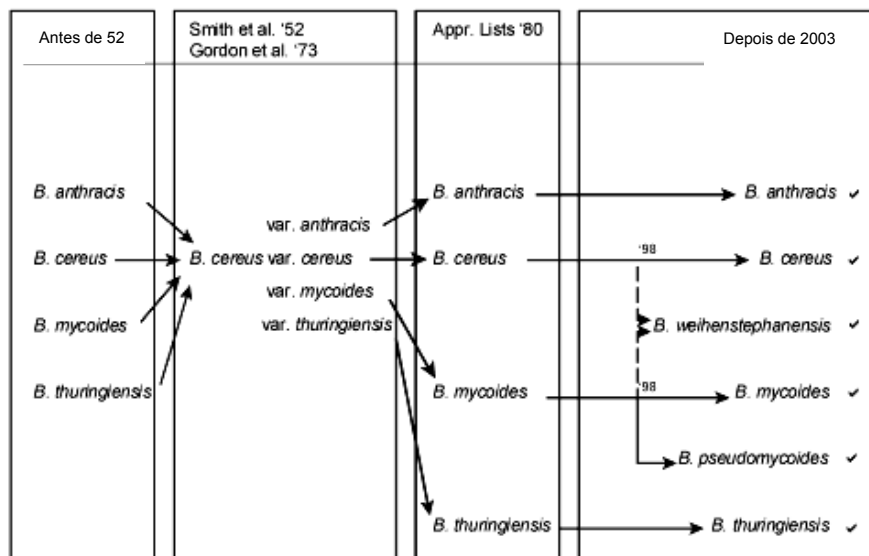
Legenda: O sinal positivo significa que o grupo bacteriano possui a mesma base que a sequência consenso; a presença de uma letra maiúscula significa que a composição é diferente em 90% dos casos. As letras minúsculas significam uma menor ocorrência da base (<15% dos casos). Adaptado de Prescott, Harley & Klein's, 2008.

Os microrganismos de *Bacillus cereus sensu lato* pertencem ao *phylum* Firmicutes, o qual integra bactérias gram positivas com baixa percentagem molecular de GC no seu ADN (32-62%). Este *phylum* divide-se em três classes: classe Clostridia, Mollicutes e Bacilli.

O *Bacillus cereus sensu lato* está incluído na classe Bacilli, ordem Bacillales e família Bacillaceae. Esta família é formada por dezassete géneros, de onde se destaca o género *Bacillus*. Este género é o mais extenso de toda a ordem Bacillales. É formado por bastonetes gram positivos, quimioheterotróficos, sendo normalmente móveis devido à presença de flagelos peritricos. São bactérias formadoras de esporos (Prescott *et al.*, 2008). O género *Bacillus* foi estabelecido em 1872 por Ferdinand Julius Cohn, incluindo apenas duas espécies: *Bacillus anthracis* e *Bacillus subtilis*. Desde essa data e até à 5ª edição do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, em 1939, que o número de espécies dentro deste género aumentou para 146, estabelecendo que *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis* constituíam espécies distintas. Só os estudos comparados de Smith *et al.* (1952) e Gordon *et al.* (1973) (citados por Vilas-Bôas *et al.*, 2007) permitiram a redução para 22 espécies do género *Bacillus*, sendo *B. cereus* classificado como uma espécie constituída por quatro variantes: var *anthracis*, var *cereus*, var *mycoides* e var *thuringiensis* (Figura 1) (Fritze, 2004). Em 1980, com a publicação da *Approved List of Bacterial Names*, as variantes de *B. cereus* voltaram a constituir quatro espécies distintas.

Figura 1 – Desenvolvimento taxonómico de *B. cereus sensu lato*.

Fonte: Fritze, 2004



Com base na evolução dos métodos de análise e da biotecnologia, a classificação das diferentes espécies nos vários taxa bacterianos tem sofrido constante adaptação. Este facto condiz com as alterações recorrentes na classificação taxonómica do grupo *B. cereus*.

O termo não taxonómico “grupo *Bacillus cereus*” é utilizado para fazer referência a um grupo de microrganismos cuja taxonomia ainda hoje é motivo de estudo e discussão. Este grupo é composto por seis espécies: *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis*. Neste trabalho, *B. cereus* ao nível espécie será referido como *B. cereus sensu stricto* enquanto que *B. cereus* como conjunto de espécies será referenciado como *B. cereus sensu lato*.

Existem vários estudos que sugerem que *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis* deveriam ser considerados membros de uma única espécie, designada *B. cereus sensu lato* (Helgason *et al.* 2000; Fritze 2004; Bavykin *et al.* 2004). Fritze (2004) através de uma técnica de hibridação ADN/ADN obteve uma homologia de 50 a 60 % entre as estirpes padrão das espécies de *B. cereus sensu lato* e algumas das sequências de ARNr 16S são virtualmente idênticas. Relativamente a *B. anthracis*, hibridações ADN/ADN entre diferentes estirpes revelaram mais de 90% de homologia, o que está de acordo com a ausência de polimorfismo nesta espécie. Helgason *et al.* (2000), realizando uma análise de *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE) e uma análise a nove genes cromossomais, demonstraram que *B. anthracis* deveria ser considerado como uma estirpe de *B. cereus*. Carlson, Caugat & Kolstø (1994) verificaram não ser possível distinguir *B. cereus* de *B. thuringiensis* através de *pulsed-field gel electrophoresis* nem através de MLEE. A única diferença estabelecida entre estas duas espécies reside na presença de genes que

codificam a toxina insecticida de *B. thuringiensis*, codificada em plasmídeos. No entanto, a perda destes plasmídeos pelas estirpes de *B. thuringiensis* impossibilitam a sua distinção das estirpes de *B. cereus*.

Estudos de filogenia mostraram ainda que, existem estirpes de *B. cereus* e *B. thuringiensis* que estão mais próximas de *B. anthracis* do que de outras estirpes de *B. cereus* e *B. thuringiensis* testadas nesses mesmos estudos. Existem também estirpes de *B. cereus* que filogeneticamente se inserem em linhagens de *B. thuringiensis* (Priest, Barker, Baillie, Holmes & Maiden, 2004; Tourasse, Helgason, Økstad, Hegna & Kolstø, 2006).

A análise das sequências de ADNr 16S, de ADNr 23S e da região ADNr 16S-23S de *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* e *B. weihenstephanensis* revelam a existência de uma elevada homologia da sequência de nucleótidos (Manzano, Cocolin, Cantoni & Comi, 2003), apoiando a teoria de que estas espécies deveriam ser consideradas como uma única.

Existem, no entanto, autores que defendem que os membros do grupo *B. cereus* constituem diferentes espécies. Estudos realizados por Radnedge *et al.* (2003), Chang, Shangkuan, Lin & Liu (2003), entre outros, demonstram que é possível a diferenciação entre as espécies deste grupo recorrendo à análise genética. Chang *et al.* (2003) descreveram um método de classificação de *B. cereus sensu lato* com base na análise da sequência nucleotídica do gene *groEL*. Este é um gene *housekeeping*¹ que codifica uma proteína altamente conservada cuja função é essencial para a sobrevivência das bactérias. A transmissão horizontal deste gene é tão rara como para os genes do ARNr. A partir da sequenciação do gene *groEL* foi possível a diferenciação de estirpes de *B. anthracis*.

As espécies de *B. cereus sensu lato* são classificadas como distintas devido essencialmente às suas diferenças fenotípicas. Assim, as estirpes de *B. anthracis* caracterizam-se pela formação de uma cápsula (cujo gene se encontra codificado no plasmídeo PXO2) e pela produção de toxinas (sendo o gene produtor da toxina codificado pelo plasmídeo PXO1) que conduzem ao aparecimento do carbúnculo no Homem e nos animais, doença conhecida como antraz (Arnesen, Fagerlund & Granum, 2008). As estirpes de *B. thuringiensis* apresentam cristais paraesporais e as de *B. cereus* não apresentam nenhuma das características referidas anteriormente, sendo responsáveis pelo aparecimento de toxinfecções alimentares (Arnesen *et al.*, 2008). O aparecimento de colónias, em agar, de crescimento rizóide e constituídas essencialmente por ácidos gordos é característico de *B. mycoides* e *B. pseudomycoides*, enquanto que a espécie *B. weihenstephanensis* é constituída por estirpes psicrotróficas com crescimento abaixo dos 7°C, mas não acima dos 38°C (Lechner *et al.*, 1998).

¹ Gene housekeeping – é um gene envolvido nas funções básicas para a manutenção celular. Os genes housekeeping são constantemente expressos na maioria das células, se não em todas.

Apesar destas diferenças fenotípicas, a comparação da sequência de nucleótidos de ADNr 16S revela uma divergência entre espécies inferior a 1%, muito abaixo do valor recomendado para a diferenciação entre espécies (3%). Assim, a similaridade das sequências de ADNr 16S bem como as diferentes características fenotípicas das estirpes são as premissas que geram maior discussão sobre a classificação taxonómica do grupo *B. cereus*.

2. Características microbiológicas

O termo *Bacillus* significa pequeno bastão e *cereus* pode ser traduzido do latim como semelhante a cera. A designação reflecte o fácil reconhecimento morfológico de *B. cereus* tanto a nível microscópico como em placas de agar (Arnesen *et al.*, 2008).

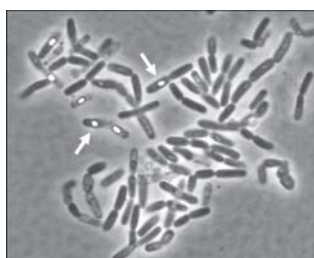
Os microrganismos de *B. cereus sensu lato* são ubiqüitários encontrando-se naturalmente no solo e na água. Este microrganismo mantém-se estável na natureza, sendo resistente a vários factores ambientais e condições adversas. Esta propriedade advém do facto de formar esporos, estruturas de difícil inactivação.

B. cereus sensu stricto é um bastonete gram positivo, aeróbio facultativo, caracterizado pela formação de esporos. Apresenta duas formas morfológicas: endosporo e célula vegetativa.

Os esporos de *B. cereus* possuem forma elipsóide, com localização central ou pericentral, sem provocar deformação da célula (Figura 2) (Arnesen *et al.*, 2008). Os esporos contêm uma *signature molecule*, o ácido dipicolínico (ácido 2,6-piridinedicarboxílico, DPA), que possui um papel fundamental na esporulação, germinação e estrutura dos esporos.

Figura 2 – Microscopia de contraste de fase de *B. cereus* evidenciando os esporos (indicado pela seta)

Fonte: Bhunia, 2007



As células vegetativas são bastonetes de dimensão de 1,0-1,2 x 3,0-5,0 μm , geralmente móveis (devido à existência de flagelos peritricos) e maioritariamente mesófilas, desenvolvendo-se a temperaturas entre os 10°C e os 48°C, com temperatura óptima de crescimento entre os 25°C e os 37°C. No entanto é importante salientar a existência de estirpes psicrotróficas, que apresentam uma temperatura de crescimento abaixo dos 7°C, mas não acima dos 38°C (Lechner *et al.*, 1998) e da existência de estirpes termófilas, como a estirpe NVH391-98 isolada num surto de toxinfecção alimentar que provocou três casos fatais (Lund, Buyser & Granum, 2000), que se desenvolve a temperaturas superiores a 50°C (Auger *et al.*, 2008).

As estirpes do grupo *B. cereus* desenvolvem-se num intervalo bastante amplo de valores de pH de 4,0 a 9,3, sendo tolerantes a concentrações de cloreto de sódio (NaCl) de 7% (Bhunja, 2008). O valor mínimo de actividade da água (a_w) que possibilita o crescimento das bactérias deste grupo é de 0,92 (Arnesen *et al.*, 2008).

A bactéria *B. cereus sensu stricto* utiliza a glucose como fonte de carbono (mas não o manitol, a arabinose nem a xilose), hidrolisa o amido e a gelatina (com excepção das estirpes produtoras de cereulida que não utilizam o amido). A fermentação dos açúcares pode ser avaliada através da realização do teste API CHB[®] (Biomérieux), que consiste numa galeria de 49 pocilhos, cada um contendo um açúcar diferente e o indicador de pH vermelho fenol. A metabolização dos açúcares provoca a acidificação do meio, passando a cor de vermelho a amarelo.

B. cereus sensu stricto apresenta actividade hemolítica, é resistente à penicilina e produz lecitinase. Esta bactéria necessita de três L-aminoácidos para o seu desenvolvimento: a treonina, leucina e a valina.

A Tabela 2 resume as características bioquímicas que podem ser utilizadas para caracterizar *B. cereus sensu stricto*, distinguindo-o de outros membros do grupo *B. cereus*.

Tabela 2 – Características fenotípicas do grupo *Bacillus cereus*.

Característica	<i>B. cereus</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. mycoides</i>
Diâmetro médio (µm)	1,4	1,3	1,4	1,3
Cadeias de células	+	+	+	+
Mobilidade	v	v	v	v
Cápsula	v	+	-	-
Esporângio				
Forma do esporo	E (C)	E	E (C)	E
Posição do esporo	S,C	S	S	S(C)
Cristais paraesporais	-	-	+	-
Corpos paraesporais	-	-	+	-
Reacção Voges-Proskauer	+	+	+	+
Hemólise (eritrócitos de ovelha)	+	-	+	-
Catalase	+	+	+	+
Lecitinase	+	+	+	(+)
Decomposição da tirosina	+	(+)	+	(+)
Resistência à lisozima	+	+	+	+
Sensibilidade à penicilina	-	+	-	-
Hidrólise da ureia	v	-	+	v
Hidrólise da caseína	+	+	+	+
Hidrólise do amido	+	+	+	+
Arginina dihidrolase	v (-)	-	+	v
Produção de indol	-	-	-	-
Hidrólise da gelatina	+	(+)	+	+
Redução do nitrato	(+)	+	+	(+)
Gás a partir de carboidratos	-	-	-	-
Ácido a partir de:				
D-Arabinose	-	-	-	-
Glicerol	+	-	+	+
Glicogénio	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-
Salicina	+	-	(+)	(+)
D-Treose	+	+	+	+

Legenda: +, >85% positivos; (+), 75-84% positivos; v, variável (26-74% positivos); (-), 16-20% positivos; -, 0-15% positivos;

Forma do esporo: E, elipsóide; C, cilíndrico; Posição do esporo: C, central ou pericentral; S, subterminal

Adaptado de Rajkowski & Bennett (2003), Bhunia (2008) e Murrey, Baren, Jørgensen, Landry & Pfaller, (2007).

Classicamente, as características que distinguem *B. cereus* de outras bactérias aeróbias formadoras de endosporos são a sua incapacidade para produzir ácido a partir do manitol e o facto de produzir lecitinase (Fritze, 2004). O método para contagem de *B. cereus* em alimentos foi padronizado pela *International Organization for Standardization* (ISO) e é baseado no crescimento em agar com D-manitol, gema de ovo e polimixina B (*Mannitol Egg Yolk Polymyxin* – MYP). A polimixina B é um agente selectivo que inibe bactérias Gram-negativas, o agar contém D-manitol como substrato de fermentação e vermelho de fenol como indicador da presença de ácido. Como *B. cereus* não consegue fermentar o manitol não há formação de ácido e as suas colónias ficam cor-de-rosa devido ao vermelho de fenol. Devido à gema de ovo surge uma zona de precipitação em torno das colónias com capacidade de produzir lecitinase, como é o caso da maior parte das estirpes de *B. cereus*.

3. Patogénese

B. cereus sensu stricto é um microrganismo oportunista com capacidade de provocar patologia intestinal e não-intestinal (Schoeni & Wong, 2005). A patogenicidade deste microrganismo é o reflexo da sua capacidade de criar formas de resistência (esporos), que lhe permite sobreviver sob condições ambientais adversas, e produzir vários factores de virulência. A virulência de *B. cereus* é atribuída a diferentes factores extracelulares, quer a toxinas, quer a enzimas (Kotiranta, Lounatmaa & Haapasalo, 2000).

3.1. Factores de Virulência

O termo virulência (do latim *virulentia*, veneno) refere-se à intensidade ou grau de patogenicidade de um microrganismo (Prescott *et al.*, 2008). A patogenicidade é um termo geral que se refere ao potencial de um microrganismo para causar doença. Várias características físicas e químicas das bactérias, como estruturas que facilitam a adesão a um hospedeiro ou moléculas que ultrapassam as barreiras do hospedeiro, contribuem para a patogenicidade e consequentemente para a virulência. As características próprias de um microrganismo que conferem virulência são designados factores de virulência. A virulência é determinada por três características do microrganismo: capacidade de invasão, de infecção e potencial patogénico (Prescott *et al.*, 2008).

O potencial patogénico é dado principalmente pela toxicidade do microrganismo, ou seja, pela capacidade de produzir toxinas e substâncias químicas capazes de provocar um dano no hospedeiro e em despoletar uma doença.

B. cereus sensu stricto pode produzir várias toxinas e enzimas responsáveis pelo seu efeito patogénico, incluindo a toxina emética e as enterotoxinas diarreicas.

A toxina emética, cereulida, é um dodecadepsipéptido cíclico, de 1,2 kDa, termo-estável, constituído por três repetições de quatro aminoácidos modificados: d-O-Leu-d-Ala-l-O-Val-l-Val (Agata *et al.*, 1994; Ehling-Schulz *et al.*, 2006). Esta toxina é responsável pela síndrome emética de *B. cereus* provocada pela ingestão de alimentos contaminados com cereulida e caracteriza-se por não fermentar a salicina nem hidrolisar o amido (Agata *et al.*, 1996). A cereulida é tóxica para as mitocôndrias, actuando como um ionóforo de potássio, e inibe também as células *natural killer* humanas.

Existem pelo menos três enterotoxinas associadas a surtos de toxinfecção alimentar: a hemolisina BL (HBL), a enterotoxina não-hemolítica (NHE) e a citotoxina K. A enterotoxina T e a enterotoxina FM não foram ainda associadas a nenhum caso de toxinfecção alimentar (Granum & Lund, 1997; Choma & Granum, 2002), no entanto estas cinco enterotoxinas são consideradas factores de virulência de *B. cereus sensu stricto* (Minnaard *et al.*, 2007). As enterotoxinas de *B. cereus* irão ser caracterizadas mais pormenorizadamente no capítulo 4. Para além destas toxinas, *B. cereus sensu stricto* produz várias hemolisinas responsáveis pela sua actividade hemolítica (Kotiranta *et al.*, 2000):

- ↳ hemolisina I, uma citolisina inibida pelo colesterol, termo-lábil (também designada cereolisina O) e activada pelo tiol;
- ↳ hemolisina II, uma toxina termo-lábil, não inibida pelo colesterol, pertencente à família das toxinas β -barril formadoras de poros (Kotiranta *et al.*, 2000);
- ↳ hemolisina III, uma proteína de 24.4 kDa (Baida & Kuzmin, 1995), que provoca a lise dos eritrócitos através da formação de poros transmembrana (Baida & Kuzmin, 1996).

Bacillus cereus sensu stricto é também produtor de várias enzimas que desempenham um papel muito importante na virulência deste microrganismo. Estas enzimas incluem: fosfolipases, lecitinase, esfingomielinase, collagenase, protease, amilase e β -lactamase.

A fosfolipase C é um factor de virulência de inúmeras bactérias patogénicas. Contribui para a destruição tecidual através da desgranulação dos neutrófilos humanos (Beecher, Pulido, Barney & Wong, 1995). *Bacillus cereus sensu stricto* produz três tipos diferentes de fosfolipase C: a fosfatidilinositol hidrolase, fosfatidilcolina hidrolase e a esfingomielinase hemolítica. A fosfolipase C induz a produção da matriz metaloproteínase (MMP) nas células epiteliais do Homem, especialmente da MMP-9, conduzindo à destruição do epitélio do tecido infectado e à degradação da matriz subepitelial (Firth, Putnins, Larjava & Uitto, 1997).

As β -lactamases conferem resistência aos antibióticos β -lactâmicos, como a penicilina, e a esfingomielinase hidrolisa a esfingomielina em ceramida e fosforilcolina localizadas nas membranas plasmáticas das células eucariotas (Bhunja, 2008).

As componentes estruturais de *B. cereus sensu stricto* são também factores que contribuem para a virulência. Este é um microrganismo formador de esporos o que, para além de permitir a sobrevivência em condições extremas, é responsável pela maior aderência às células. Os esporos de *B. cereus* são mais hidrofóbicos que nas restantes espécies do género *Bacillus* (Andersson, Granum & Rönnér, 1998), o que lhes permite uma maior aderência às superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas, do que as células vegetativas. A maior hidrofobicidade dos esporos é responsável por aumentar a adesão à superfície das células intestinais, o que contribui como factor adicional de virulência.

Em isolados de *B. cereus* responsáveis por doença periodontal detectou-se a presença de uma camada de glicoproteína, designada *S-layer*, envolvendo a parede celular (Kotiranta *et al.*, 2000). A presença da proteína *S-layer* em torno da parede celular das células vegetativas de *B. cereus sensu stricto* tem uma função muito importante na determinação da hidrofobicidade da superfície celular. As estirpes constituídas por esta proteína são mais hidrofílicas o que lhes permite uma maior aderência ao colagénio tipo I, laminina, fibronectina e ao fibrinogénio e, consequentemente, uma ligação efectiva à matriz proteica. A proteína *S-layer* também aumenta a resistência das bactérias à fagocitose.

3.2. Patologia

B. cereus sensu stricto é um agente causador de toxinfecção alimentar, mas também é responsável pelo aparecimento de doença não gastrointestinal.

Esta bactéria é uma das principais causadoras de endoftalmite pós-traumática e metastática (Beecher *et al.*, 1995). Os microrganismos de *B. cereus sensu lato* são responsáveis, em média, por 39% dos casos de endoftalmite associados a trauma e são também os principais causadores de endoftalmite bacteriana metastática em toxicodependentes. A endoftalmite por *B. cereus* caracteriza-se por dor severa, lacrimejamento, proptose extrema, edema e abcesso da córnea. Esta infecção pode evoluir para enucleação em 24 a 48 horas.

B. cereus sensu stricto também pode causar outras infecções sistémicas e locais (especialmente em pessoas imunodeprimidas, neonatos, toxicodependentes e pacientes com história de feridas traumáticas, cirúrgicas e cateteres) nomeadamente queratite e panoftalmite, infecções cutâneas primárias, infecção de feridas ortopédicas, osteomielite, periodontite, infecções pleuropulmonares, endocardite, infecção urinária, meningite pós-

operatória e infecções sistémicas (Kotiranta *et al.*, 2000; Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2008).

A nível gastrointestinal, *B. cereus sensu stricto* é responsável pelo aparecimento de duas patologias: a síndrome emética e a síndrome diarreica. Ambas são geralmente pouco graves e auto-limitantes, embora estejam já descritos casos de maior gravidade e mesmo letais (Lund *et al.*, 2000; Dietrich *et al.*, 2005).

B. cereus foi estabelecido como um microrganismo causador de toxinfecção alimentar nos anos 50, com os primeiros surtos a serem descritos na Noruega entre 1947 e 1949, caracterizados pela síndrome diarreica (Arnesen *et al.*, 2008).

3.2.1. Síndrome emética

A síndrome emética foi descrita pela primeira vez no Reino Unido, no início dos anos 70, após vários surtos causados pela ingestão de arroz cozido. Esta doença é causada pela toxina emética de *B. cereus*, cereulida, produzida nos alimentos antes da sua ingestão. Os sintomas ocorrem 30 minutos a 6 horas após a ingestão dos alimentos (Ehling-Schulz *et al.*, 2006) e caracterizam-se por náusea e vômito. A dose tóxica de cereulida corresponde a 8-10 µg por quilo de peso vivo, em modelo animal, estando também descrita uma quantidade inferior a 8 µg por quilo de peso vivo num surto de toxinfecção alimentar (Jääskeläinen 2008).

A cereulida vai ligar-se aos receptores 5-HT₃ do nervo vago, no estômago, induzindo desta forma o vômito. Por outro lado, esta toxina pode também ser responsável por insuficiência hepática, uma vez que actua como um ionóforo de potássio e inibe a oxidação dos ácidos gordos alterando a actividade mitocondrial dos hepatócitos. Estas acções resultam em degeneração massiva dos hepatócitos e, consequentemente, em insuficiência hepática.

3.2.2. Síndrome diarreica

A síndrome diarreica é uma toxinfecção que se caracteriza por dor abdominal, diarreia aquosa e ocasionalmente náusea e vômito. O período de incubação é superior a 6 horas, aparecendo sintomatologia normalmente 8 a 16 horas após a ingestão dos alimentos. A sintomatologia prolonga-se por 12 a 24 horas (Arnesen *et al.*, 2008).

A síndrome diarreica é provocada pela ingestão de alimentos contaminados com estirpes de *B. cereus* enterotóxicas. Estas estirpes, se atingirem o intestino delgado em quantidade suficiente, originam a produção de enterotoxinas, as grandes causadoras desta síndrome. O

mecanismo de acção destas toxinas sobre as células intestinais encontra-se descrito mais pormenorizadamente no capítulo 4.

A dose infecciosa de *B. cereus* situa-se nas 10^5 - 10^8 células ou esporos, no entanto, contagens de 10^3 UFC/g foram encontradas em alimentos causadores de toxinfecção alimentar (Arnesen *et al.*, 2008). É importante salientar que menores quantidades de esporos podem estar associadas a surtos de toxinfecção alimentar, uma vez que são mais resistentes à acção do ácido gástrico do que as células vegetativas.

3.3. Epidemiologia

Os casos de toxinfecção alimentar que continuam a não ser reportados às autoridades de saúde de cada país são ainda muitos, não permitindo um estudo epidemiológico fiável sobre a incidência real desta patologia.

A incidência de toxinfecção alimentar por *B. cereus sensu stricto* está presumivelmente subestimada, por um lado porque não é uma doença de declaração obrigatória, por outro porque é uma patologia geralmente auto-limitante, não sendo, na maioria dos casos, necessário recorrer ao serviço hospitalar.

Não existe um grupo da população específico com risco acrescido de toxinfecção alimentar por *B. cereus*. No entanto, indivíduos com pH gástrico mais alcalino, como por exemplo, os idosos ou os indivíduos que sofrem de acloridria, são mais susceptíveis à doença, uma vez que existe um maior número de bactérias a sobreviver à acidez do estômago e, por sua vez, a atingir o intestino delgado.

3.3.1. Incidência da toxinfecção alimentar por *B. cereus sensu stricto*

B. cereus sensu stricto pode ser um problema relevante na restauração colectiva, uma vez que não é eliminado pela higienização de superfícies nem por tratamentos de pasteurização, além de ser consideravelmente resistente à radiação gama (Kotiranta *et al.*, 2000; Ehling-Schulz *et al.*, 2004). A título de exemplo, uma investigação dos surtos de toxinfecção alimentar ocorridos nas Forças Armadas Alemãs, identificou *B. cereus* como o agente patogénico mais frequente, tendo este microrganismo sido responsável por 30% dos casos e 42% dos surtos declarados entre 1985 e 2000 (Ehling-Schulz *et al.*, 2004).

Na Noruega, Finlândia, Bulgária e Hungria a forma predominante de toxinfecção por *B. cereus sensu stricto* é a síndrome diarreica, enquanto que no Reino Unido, Estados Unidos e Japão a forma emética é mais comum. Aliás, no Japão, a forma emética está descrita

como sendo dez vezes mais frequente do que a forma diarreica (Granum & Lund, 1997; Kotiranta *et al.*, 2000; Ehling-Schulz *et al.*, 2004).

Com base no relatório *The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006*, da EFSA (*European Food Safety Authority*, 2006) pode-se constatar que na União Europeia foram reportados 5710 surtos de toxinfecção alimentar (mais 399 que no ano de 2005), de entre os quais 13 ocorreram em Portugal (mais dez que no ano 2005). O principal microrganismo responsável pelos surtos de toxinfecção alimentar reportados corresponde à *Salmonella* (com 3131 casos), ocupando os microrganismos do género *Bacillus* o oitavo lugar com 78 surtos. A toxinfecção provocada por toxinas é a quinta causa mais frequente. As toxinas de *Bacillus cereus* foram responsáveis por 77 surtos, correspondendo a 17.1% dos casos (Tabela 3). Os principais alimentos envolvidos corresponderam a carne e produtos cárneos e cereais (incluindo arroz), no entanto na maior parte dos casos não foi possível descobrir a fonte. Este surtos ocorreram principalmente em restaurantes (57.1%), tendo o maior surto ocorrido na Bélgica através de leite contaminado com *B. cereus*.

Tabela 3 – Incidência de surtos de toxinfecção alimentar por toxinas na Europa, em 2006.

Adaptado de EFSA Journal, 2007

Agente	Surto		Casos		
	Geral	Familiar	Nº total	Nº admitidos no hospital	Nº mortes
<i>B. cereus</i>	65	12	941	34	0
<i>B. licheniformis</i>	1	0	23	-	-
<i>C. Botulinum</i>	3	15	33	33	1
<i>C. perfringens</i>	52	11	1618	11	1
<i>S. aureus</i>	156	79	2053	277	2
<i>Staphylococcus spp.</i>	7	1	320	101	0
Outras toxinas	13	58	473	121	3
Toxinas, não especificado	1	7	43	34	0
Total	296	183	5504	611	7

Com base no oitavo relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), *WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe*, correspondente ao período 1999-2000, Portugal reportou um surto de toxinfecção alimentar por *B. cereus* em 1999 (que atingiu sete pessoas) e outro em 2000, atingindo seis pessoas.

Para além da não declaração dos surtos, outro factor que pode contribuir para que a importância de *B. cereus sensu stricto* como agente patogénico alimentar seja subestimada é o diagnóstico não adequado, uma vez que a doença causada por este agente pode ser confundida com outros tipos de toxinfecção alimentar. De facto, a síndrome diarreica é

semelhante aos sintomas causados por *Clostridium perfringens*, enquanto que a síndrome emética do *B. cereus sensu stricto* é bastante similar à causada por *Staphylococcus aureus* não sendo possível distinguir estas duas entidades em termos clínicos (Rajkowski & Bennett, 2003).

3.3.2. Alimentos envolvidos em toxinfecção alimentar por *B. cereus*

Os membros do grupo *B. cereus* são microrganismos ubiqüitários encontrando-se distribuídos no meio ambiente, principalmente devido à sua capacidade de produzir esporos. Desta forma, estes microrganismos podem contaminar facilmente diversos tipos de alimentos, com especial relevância para os produtos de origem vegetal.

Este microrganismo é frequentemente isolado no leite, quer no leite cru, quer no leite processado termicamente (Bastoszewicz, Hansen & Swiecicka, 2008) e nos seus derivados (Molva, Sudagidan & Okuklu, 2009), nos produtos frescos (Svensson, Monthán, Guinebrière, Nguyen-The & Christiansson, 2007) na carne e produtos cárneos (Borge, Skeie, Sørhaug, Langsrud & Granum, 2001), arroz cozido ou frito (Cronin, Martin & Wilkinson, 2009), vegetais prontos a comer e especiarias (Ouoba, Thorsen & Varnam, 2008).

4. Enterotoxinas de *Bacillus cereus sensu stricto*

Bacillus cereus sensu stricto possui capacidade de produzir cinco diferentes enterotoxinas, a enterotoxina hemolítica BL (HBL; Beecher *et al.*, 1995), a enterotoxina não hemolítica (NHE; Granum *et al.*, 1999), citotoxina K (CytK; Lund *et al.*, 2000), a enterotoxina T (BceT; Agata, Ohta, Arakawa & Mari, 1995) e a enterotoxina FM (Asano, Nukumizo, Bando, Lizuka & Yamamoto, 1997). As enterotoxinas são secretadas por *B. cereus* no início da fase estacionária do crescimento bacteriano (Lindbäck & Granum).

4.1. Enterotoxina Hemolítica BL (HBL)

A hemolisina BL, a primeira enterotoxina descrita (Beecher & MacMillan, 1990), desempenha um papel importante na síndrome diarreica, sendo também um factor de virulência responsável pela endoftalmite por *B. cereus* (Beecher *et al.*, 1995).

A HBL foi originalmente purificada a partir da estirpe *B. cereus* F837/76, isolada de uma ferida pós-operatória (Arnesen *et al.*, 2008). Inicialmente pensou-se que esta toxina era formada por duas componentes, a B, o elemento de ligação à célula alvo, e a L, a componente lítica (Beecher & MacMillan, 1990). No entanto Beecher & MacMillan (1991) demonstraram que a enterotoxina hemolítica BL é uma toxina tripartida constituída por uma componente de ligação às células, a B, e duas componentes responsáveis pela lise celular, a L₁ e a L₂. Estes três elementos são necessários para a actividade da toxina.

As características físicas de cada um dos componentes da HBL encontram-se descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Propriedades físicas dos três componentes da enterotoxina HBL

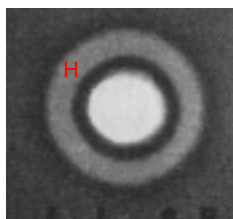
(Adaptado de Beecher & Wong, 1994)

HBL	Massa molecular	Ponto Isoelétrico	Sequência N-terminal
B	37,5	5,34±0,012	S-E-I-Q-T-N-N-G-D-T-A-L
L1	38,5	5,33±0,008	x- E-T-1-A-Q-E-Q-K-V-G-N-Y-A-L-G-P-E
L2	43,2	5,33±0,016	E-T-Q-x-E-N-M-D-I-x-S

As actividades biológicas do complexo HBL incluem: hemólise, acumulação de fluido em ansa ileal de coelho, reacção de permeabilidade vascular dermonecrótica em pele de coelho e citotoxicidade nas células ovárias do hamster chinês e na retina (Beecher & MacMillan, 1990; Beecher & Wong, 1994; Beecher, Schoeni & Wong, 1995). Cada componente, por si só, não produz alterações biológicas; é necessário a expressão dos três componentes da HBL para que uma dada estirpe de *B. cereus* seja, neste contexto, potencialmente patogénica.

A hemolisina BL produz um característico e peculiar padrão de hemólise em gel difusão (Beecher & Wong, 1994). Quando os três componentes da toxina se adicionam simultaneamente a um pocilho contendo agar sangue, a hemólise não se inicia imediatamente. Após um período de difusão, a hemólise verifica-se a uma determinada distância do centro do pocilho (normalmente alguns milímetros), formando um anel em torno do mesmo (Figura 3). Este fenómeno designa-se por hemólise difusa. Com o passar do tempo, as células incluídas no anel são completamente lisadas, no entanto a hemólise não ocorre muito além do diâmetro inicial do anel.

Figura 3 – Reacção de hemólise da enterotoxinas HBL. Legenda: H, zona de hemólise
(Fonte: Beecher & Wong, 1994)



A hemolisina BL é codificada a nível cromossomal por quatro genes: *hblA*, que codifica a componente B; *hblC* e *hblD* que codificam a L₂ e L₁ respectivamente. Por vezes pode estar incluído um gene que mostra uma elevada homologia com o *hblA*, o gene *hblB*, cuja ausência não impede a actividade biológica da toxina.

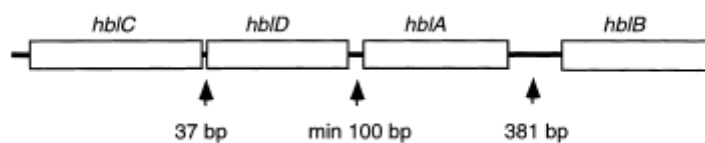
O gene *hblA* é formado por uma *open reading frame* (ORF) de 1127 pb, codificando uma proteína de 41 kDa, precedida por um possível local de ligação ao ribossoma (Heinrichs, Beecher, MacMillan & Zilinskas, 1993). A sequência de aminoácidos deduzida a partir da de nucleótidos inclui 31 aminoácidos antes do primeiro resíduo correspondente à componente B, que constitui a sequência sinal da proteína, uma estrutura imprescindível no processo de secreção de proteínas pelas bactérias gram positivas, pela via Sec-dependente. Após a clivagem da sequência sinal forma-se a proteína madura com 37,5 kDa.

O gene *hblC* é formado por uma ORF de 1343 pb, codificando uma proteína de 50 kDa, enquanto que o gene *hblD* é formado por 1154 pb codificando uma proteína de 41 kDa. A análise da sequência nucleotídica do gene *hblC* revela que a proteína L₂ é sintetizada, em primeiro lugar, como uma proteína precursora de 50 kDa e uma sequência sinal de 33 aminoácidos. Esta última sequência é processada originando a forma madura da toxina com 43 kDa. O mesmo sucede com o gene *hblD*, em que se forma uma proteína precursora de 41 kDa com uma sequência sinal de 30 aminoácidos, cuja clivagem origina a proteína final de 38.5 kDa (Ryan, MacMillan & Zilinskas, 1997).

O gene *hblB* foi originalmente identificado por Heinrichs *et al.* (1993) enquanto realizavam a sequenciação do gene *hblA* em *B. cereus* F837/76. O gene *hblB* é, possivelmente, um pseudogene, uma vez que não é transcrito a um nível detectável e que a transcrição dos genes *hblCDA* pelo ARNm parece terminar dentro do gene *hblB* (Lindback, Økstad, Rishovd & Kolstø, 1999). Com base na análise de nucleótidos, *hblB* parece ter sido formado pela duplicação dos primeiros 1092 pb do gene *hblA* e pela fusão com uma ORF na extremidade 3' (Arnesen *et al.*, 2008). Os genes que codificam a enterotoxina HBL encontram-se incluídos num único operão, localizado no cromossoma, estando os genes organizados pela seguinte ordem: *hblC*, *hblD*, *hblA* e *hblB* (Figura 4). A expressão da toxina é regulada pelo regulador transcricional PlcR (regulador fosfolipase C).

Figura 4 – Organização do operão *hbl*.

(Fonte: Granum & Lund, 1997)



4.2. Enterotoxina não-hemolítica (NHE)

A enterotoxina não-hemolítica foi caracterizada pela primeira vez após um surto de toxinfecção alimentar na Noruega, em 1995, causado pela estirpe *B. cereus* NVH 0075/95 HBL-negativa (Lund & Granum, 1996).

A NHE é uma toxina tripartida formada por três componentes: *nheA* (41 kDa), *nheB* (39,8 kDa) e *nheC* (36,5 kDa) (Lindbäck, Fagerlund, Rodlandt & Granum, 2004). Nesta enterotoxina, o componente responsável pela ligação às células alvo é o *nheB*.

As propriedades da proteína NHE encontram-se resumidas na Tabela 5.

Tabela 5 – Propriedades físicas da enterotoxina não-hemolítica.

(Adaptado de Arnesen *et al.*, 2008)

NHE	Peso molecular (kDa)	Ponto Isoelétrico	Nº aminoácidos
<i>nheA</i>	41,019	5,13	360
<i>nheB</i>	39,820	5,61	372
<i>nheC</i>	36,481	5,28	329

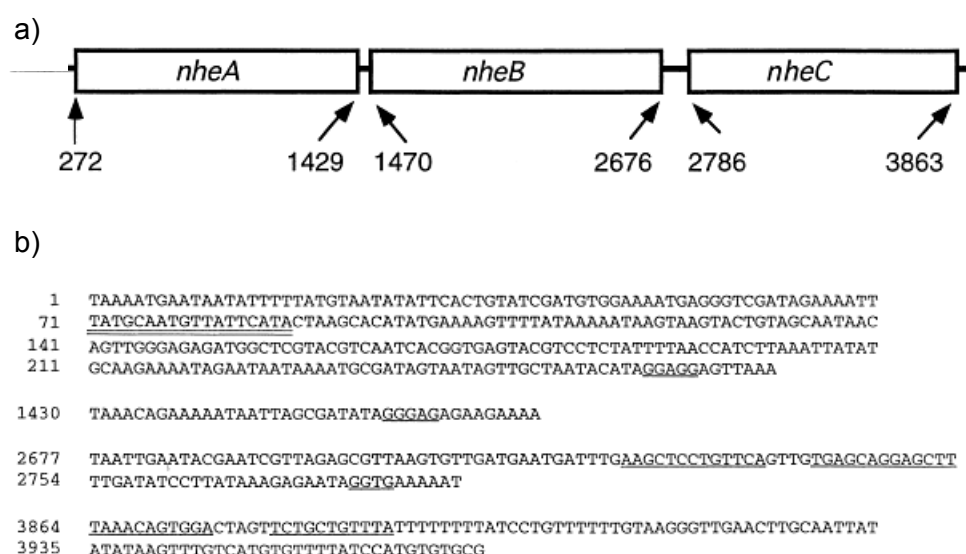
Em contraste com a toxina HBL, que apresenta actividade hemolítica, dermonecrótica e enterotóxica, a NHE revela exclusivamente propriedades citotóxicas e/ou enterotóxicas. Lindbäck *et al.* (2004) realizaram um estudo de modo a determinar e quantificar a actividade citotóxica da toxina não-hemolítica em células vero. A actividade citotóxica máxima verificou-se quando o ratio molar entre *nheA*, *nheB* e *nheC* era de 10:10:1. Um aumento da concentração de *nheC* provocava a diminuição da actividade por inibir a ligação da proteína *nheB* às células. Fagerlund, Ween, Lund, Hardy & Granum (2004) examinaram a natureza da actividade citotóxica da NHE sobre as células epiteliais, mostrando que, após a exposição a esta toxina, ocorria uma rápida disrupção da membrana plasmática com formação de poros nas bicamadas lipídicas.

Cada componente da toxina tripartida é codificado por um gene diferente. Assim, *nheA* é codificado pelo gene *nheA*, o componente B pelo gene *nheB* e o C pelo gene *nheC*. Estes

três genes encontram-se codificados num único operão de 3967 pb (Granum, O' Sullivan & Lund, 1999) (Figura 5a). O estudo da sequência do operão *nheABC* mostra a existência de um regulador de transcrição (TATGCAATGTTATTCATA) com cerca de 200 pb antes do codão de iniciação de *nheA*. Este regulador corresponde ao PlcR (Gohar *et al.*, 2008), que, tal como para a HBI, regula positivamente a transcrição dos genes que codificam a NHE. Existe um espaço de 40 pb entre o gene *nheA* e *nheB* e 109 pb entre o *nheB* e o *nheC*. Nestes 109 pb existe uma repetição invertida de 13 pb do gene *nheC* que pode resultar numa pequena produção de *nheC* (Gohar *et al.*, 2008) (figura 5b).

Figura 5 – Operão *nheABC*.

- a) Posição dos três genes, *nheA*, *nheB*, *nheC*, no operão *nhe*; os números indicam o início e o fim dos genes
b) Sequência de ADN até ao gene *nheA* e dos espaços entre os genes; a sequência duplamente sublinhada corresponde ao regulador de transcrição; as sequências com traço simples correspondem a repetições invertidas entre o *nheB* e *nheC* e entre este e o codão stop.
(Fonte: Granum *et al.*, 1999)



Enquanto que o operão *hbl* apenas está presente em cerca de 50% dos isolados de *B. cereus*, o operão *nhe* encontra-se em quase 100% das estirpes e, em muitas delas, é a única enterotoxina produzida (Granum, 2001).

4.3. Citotoxina K (CytK)

A citotoxina K (CytK) foi isolada pela primeira vez a partir de uma estirpe de *B. cereus* responsável por um surto de toxinfecção alimentar em França, em 2000: a estirpe 391-98 (Lund *et al.*, 2000). A patologia caracterizava-se por síndrome diarreica, incluindo diarreia sanguinolenta, tendo resultado em três mortes.

A CytK é uma proteína de 34 kDa com actividade dermonecrótica, citotóxica e hemolítica, mostrando um potencial citotóxico em culturas de células semelhante à HBL e NHE (Lund *et al.*, 2000). Possui a capacidade de formar poros nas bicamadas lipídicas das células, sendo também altamente tóxica para as células epiteliais do intestino humano (Hardy, Lund & Granum, 2001). Em suma, estas propriedades sugerem que a citotoxina K é responsável por casos severos de TIA com enterite necrótica associada (Lund *et al.*, 2000).

A CytK é uma toxina que pertence à família das toxinas β -barril formadoras de poros (Lund *et al.*, 2000). Esta família inclui a toxina β de *Clostridium perfringens* e a α -hemolisina de *Staphylococcus aureus*, apresentando características similares à CytK.

Lund *et al.* (2000) realizaram um estudo de identificação, purificação e sequenciação de aminoácidos da CytK (isolada a partir da estirpe NVH 391-98) obtendo uma toxina de 305 aminoácidos, massa molecular de 33,75 kDa e ponto isoeléctrico de 6,1. No entanto, a sequência de aminoácidos da CytK é muito semelhante à hemolisina II de *B. cereus* (com 37 % de homologia), a várias leucocidinas e à α -hemolisina de *S. aureus* (homologia de 32% e 30% respectivamente), sendo também semelhante à toxina β de *C. perfringens* com uma homologia de 26%.

No mesmo estudo, Lund *et al.* (2000) realizaram um PCR para pesquisa de CytK em 19 estirpes do grupo *B. cereus* que revelou apenas resultados negativos. Fagerlund *et al.* (2004) que também pesquisaram, por PCR, a presença do gene que codifica a citotoxina K, *cytK*, identificaram 13 estirpes positivas. Posteriormente procederam à sequenciação de ADN dos produtos de PCR, onde obtiveram uma sequência com homologia de apenas 89% com a estirpe NVH 391-98. Esta nova variante da CytK foi denominada CytK₂, enquanto que a isolada da estirpe 391-98 passou a ser denominada por CytK₁. Esta nova variante foi também identificada no genoma de *B. cereus* ATCC 14579 e *B. cereus* ATCC 10987, com uma homologia da sequência de aminoácidos de quase 100% entre estas duas estirpes. Geneticamente, existe uma diferença em seis posições dos nucleótidos, tanto na região putativa formadora de poros, como na região do promotor, sendo a homologia entre a CytK₁ e a CytK₂ nesta região de apenas 66-72%.

A proteína CytK₂ apresenta algumas diferenças relativamente à CytK₁ (Fangerlund *et al.*, 2004). Apesar de ambas as proteínas serem hemolíticas e de formarem poros nas bicamadas lipídicas das células, a CytK₁ expressa esta característica em proporções que

podem ser cinco vezes superiores à CytK₂. é por isso legítimo assumir que a CytK₁ representa uma maior ameaça à segurança dos alimentos do que a CytK₂.

4.4. Enterotoxina T (BceT)

A enterotoxina T é uma proteína de 41 kDa, detectada pela primeira vez em *B. cereus* B-4ac (Agata *et al.*, 1995). Estes autores demonstraram que a enterotoxina T isolada de *B. cereus* B-4ac exibia actividade citotóxica, aumentava a permeabilidade vascular, provocava acumulação de fluido em ansa ileal de coelho e era letal em ratos. No entanto, não forneceram dados quantitativos nem pesquisaram a presença ou ausência de outras enterotoxinas (como a HBL, NHE e CytK) que, em caso de positividade, poderiam falsear os resultados. Em 2002, Choma & Granum realizaram um estudo semelhante concluindo que a actividade biológica que se verificava era resultado da presença da HBL e da NHE, e não devido à presença da BceT.

Mais recentemente, Hansen, Høiby, Jensen & Hendriksen (2003) sugeriram que o gene *bceT* não existia como um único gene em *B. cereus*, mas consistia num produto resultante da fusão de quatro fragmentos durante o processo de ligação.

Independentemente dos estudos realizados, existe um facto que questiona a verdadeira acção da enterotoxina T, o facto de nunca ter sido associada a nenhum surto de toxinfecção alimentar.

4.5. Enterotoxina FM

A enterotoxina FM foi originalmente isolada da estirpe *B. cereus* FM-1, causadora de toxinfecção alimentar (Asano *et al.*, 1997). É um polipéptido de 45 kDa que, até à data, não tem sido implicado como responsável por surtos de toxinfecção alimentar. Contudo, o gene *entFM* está presente na maioria das estirpes associadas a surtos e é o gene de enterotoxina mais prevalente em todas as estirpes de *B. cereus*. Algumas experiências em laboratório mostraram que a enterotoxina FM purificada causa acumulação de líquido em modelos de ansa ileal de coelho e de rato e que é letal em ratos (Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2008).

4. 6. Regulação da expressão das enterotoxinas

A maioria das enterotoxinas de *B. cereus* é controlada pelo regulador transcricional PlcR (regulador fosfolipase C), no entanto, cada vez é mais evidente a existência de outros mecanismos de regulação envolvidos na produção das enterotoxinas.

O regulador transcricional PlcR controla a expressão da maioria dos factores de virulência de *B. cereus* (Gohar *et al.*, 2008). Este regulador faz parte de um *quorum sensing system* que permite a *B. cereus* regular a virulência dos genes de uma forma dependente da densidade celular, e activa a expressão de uma região que compreende vários factores de virulência extracelulares, incluindo as enterotoxinas HBL, NHE e CytK (Lereclus, Agaisse, Gominet, Salameitou & Sanchis, 1996). A activação da proteína PlcR, de 34 kDa, é dependente do PapR, um péptido autoindutor de 48 aminoácidos, secretado da célula pela via Sec e processado a nível extracelular. O PapR é depois reintroduzido no interior da célula como um heptâmero, por acção da oligopéptido permease (Slamti & Lereclus, 2002). Quando a densidade bacteriana aumenta, a concentração de PapR no interior das células também aumenta e, posteriormente, este péptido autoindutor interage com o PlcR facilitando a sua ligação a um motivo palindrômico altamente conservado, a *PlcR box* (TATGNAN₄TNCATA) localizada antes dos genes alvo e que activa a sua transcrição (Slamti & Lereclus, 2002).

A importância do PlcR na regulação da expressão genética foi demonstrada por Gohar, Økstad, Gilois, Sanchis & Kolstø (2002) em que a deleção do regulador resultou numa diminuição em 50% na quantidade de proteínas secretadas. Apesar da virulência diminuir com a deleção deste regulador, não foi totalmente abolida, indicando que factores adicionais não dependentes do PlcR contribuem para a virulência de *B. cereus*.

A virulência de *B. cereus* é também dependente de factores ambientais como o pH, temperatura, concentração de glucose e de oxigénio. Dupont, Zigha, Rosenfeld & Schmitt (2006) relacionou a produção de HBL e NHE com o estado metabólico da célula, verificando que *B. cereus* produzia maior quantidade de HBL em meio anaeróbico do que na presença de oxigénio. Estas condições são observadas no intestino delgado, onde ocorre a produção das toxinas.

O sistema ResDE, formado por dois componentes, e o regulador de transcrição Fnr, desempenham um papel importante na adaptação do metabolismo da célula face à quantidade de oxigénio disponível e às condições redox, regulando também a expressão das toxinas HBL e NHE (Zigha, Rosenfeld, Schmitt & Dupont, 2007; Dupont, Zigha, Rosenfeld & Schmitt, 2006).

4.7. Mecanismo de acção das enterotoxinas

As enterotoxinas, ao contrário da toxina emética, são produzidas no intestino delgado. Desta forma, para que ocorra patologia é necessário a ingestão de alimentos contaminados com *B. cereus* (esporos ou células vegetativas). Os esporos passam o estômago sem sofrer grandes alterações, atingem o intestino delgado onde germinam, crescem e produzem enterotoxinas. As células vegetativas são muito mais susceptíveis às condições no estômago e por isso, mais dificilmente atingem o intestino delgado (Clavel, Carlin, Lairon, Nguyen-The & Schitt, 2004; Wijnands, Dufrenne & Leusden, 2005; Pielaat, Wijnands, Takumi, Nauta & Leusden, 2006). No entanto, durante o consumo dos alimentos o pH do estômago aumenta. O aumento do pH depende do tipo e da quantidade de alimento ingerido. Assim, durante a ingestão dos alimentos, o pH do estômago pode atingir valores que permitem a sobrevivência das células vegetativas atingindo estas o intestino delgado. Wijnands *et al.* (2005) realizou um estudo em que submetia as células vegetativas de *B. cereus* a condições semelhantes às do estômago e posteriormente verificava se alguma dessas células aderiria a células Caco-2 (utilizadas como equivalentes às células intestinais). Wijnands *et al.* (2005) detectaram a presença das células vegetativas em estudo aderentes às células Caco-2.

Após atingir o intestino delgado, as células vegetativas ou esporos têm de permanecer durante tempo suficiente para que seja possível a produção de enterotoxinas. As bactérias do grupo *B. cereus* são dotadas de estruturas que lhes permitem uma maior aderência às células epiteliais do intestino delgado. Os esporos ao serem mais hidrofóbicos e possuírem *appendages* (projeções) conseguem uma boa aderência às células (Andersson *et al.*, 1998); as células vegetativas também são constituídas por estruturas que lhes permitem aderir às células do intestino humano: *appendages*, flagelos e a proteína *S-layer* (Kotiranta *et al.*, 2000).

Após a colonização do epitélio intestinal, as estirpes enterotóxicas de *B. cereus* produzem enterotoxinas, tal como descrito anteriormente. O modo de acção destas enterotoxinas ainda não é totalmente conhecido. Pensa-se que as enterotoxinas produzem diarreia através da estimulação do AMP cíclico, provocando uma alteração no transporte de electrões, e da formação de poros na membrana plasmática das células intestinais. Desta forma, os iões sódio e cloreto e a água passam das células epiteliais para o lúmen intestinal provocando diarreia, que neste caso se classifica como diarreia secretora (Bhunia 2008).

A enterotoxina HBL provoca a formação de poros nas membranas plasmáticas, contribuindo assim para a diarreia. Cada componente do complexo HBL liga-se à membrana plasmática das células (Figura 6) e pensa-se que este complexo forma poros transmembrana por oligomerização dos três componentes da enterotoxina. A enterotoxina HBL provoca

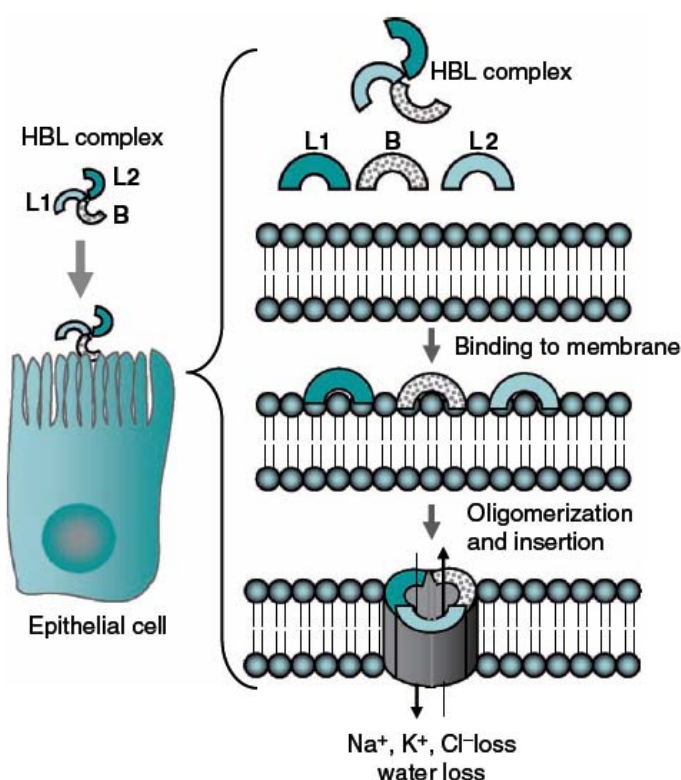
acumulação de fluido no íleo de coelho, resultando em necrose das vilosidades intestinais, edema da submucosa, infiltração de linfócitos no espaço intersticial e acumulação de sangue (Bhunia, 2008; Wijnands, Dufrenne & Leusden, 2002).

A enterotoxina NHE também forma poros transmembrana, no entanto, devido ao facto de apenas a componente nheB parecer ligar-se à membrana plasmática das células (Lindbäck *et al.*, 2004) é possível que a NHE, em vez de formar poros por oligomerização, possa actuar como uma toxina AB, em que um dos componentes é responsável por se ligar à célula (B) enquanto que o outro pelo efeito tóxico (A).

A citotoxina K também conduz à formação de poros na membrana plasmática das células intestinais. Esta toxina forma espontaneamente oligómeros resistentes ao SDS (dodequil-sulfato de sódio) mas não à fervura (Hardy, Lund & Granum, 2001).

Figura 6 – Possível mecanismo de acção da enterotoxina HBL.

(Fonte: Bhunia, 2008)



5. Metodologias para pesquisa de enterotoxinas de *B. cereus*

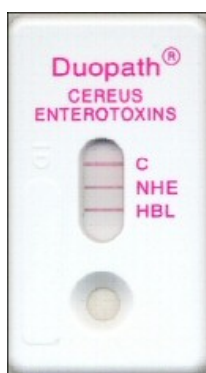
Nos dias de hoje existem vários métodos que podem ser utilizados na detecção das enterotoxinas produzidas por *B. cereus*. Devido ao facto das enterotoxinas possuírem um elevado potencial antigénico, existem já testes comerciais para detecção imunológica das

toxinas HBL e NHE, um método relativamente rápido e de fácil execução. Um dos testes existentes é o BCET-RPLA[®] (Oxoid Ltd). Este teste comercial é um método semi-quantitativo que detecta, através de aglutinação reversa (*reversed passive latex agglutination*), o componente L₂ da enterotoxina HBL, quer directamente a partir dos alimentos, quer a partir de culturas de *B. cereus*. A sensibilidade do teste corresponde a 2 ngml⁻¹. No entanto, a positividade do teste não é indicador da produção da enterotoxina, uma vez que não detecta nem o componente L₁ nem o componente B, também necessários para que seja possível a acção da enterotoxina.

Existe um segundo teste comercial que permite a detecção da componente nheA da enterotoxina não hemolítica: o TECRA-BDE[®] (Tecra International Pty Ltd). Este teste assenta num método de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). A sensibilidade do teste é superior a 1 ngml⁻¹ da amostra e o teste pode ser utilizado para amostras alimentares ou ambientais. Tal como para o teste anterior, não é possível a confirmação da presença da toxina biologicamente activa, uma vez que só se detecta um dos componentes da toxina tripartida (Arnesen *et al.*, 2008).

Recentemente, foi lançado pela Merck Chemicals um novo produto designado Duopath[®] Cereus Enterotoxins. Este consiste num teste rápido imuno-cromatográfico de detecção de estirpes de *B. cereus* produtoras das enterotoxinas NHE e HBL (Figura 7). Este teste possui uma sensibilidade de 6ng/ml para a enterotoxina NHE e 20 ng/ml para a enterotoxina HBL.

Figura 7 – Teste Duopath[®] Cereus Enterotoxins



Para detecção não específica das enterotoxinas de *B. cereus* pode-se recorrer ao teste em animais de laboratório. O teste de ansa ileal de coelho é uma das possibilidades e consiste na injeção de culturas de *B. cereus* nas ansas de coelho ligadas. Em caso de positividade do teste observa-se a acumulação de fluido. Outro teste que também pode ser utilizado, apenas para detecção não específica das toxinas, é a reacção de permeabilidade vascular

(VP) na pele de coelho. Neste teste, em caso de positividade, nota-se uma área central de necrose localizada numa zona de edema (Beecher & Wong, 1994).

Considerando que a toxina HBL produz um padrão específico de hemólise, referenciado já anteriormente como padrão descontínuo, pode ser também realizada a pesquisa de hemólise em eritrócitos de ovelha.

A utilização de culturas de células na detecção de enterotoxinas de *B. cereus* é outra metodologia que pode ser aplicada. No entanto, todas as enterotoxinas possuem actividade citotóxica não permitindo, desta forma, a diferenciação de cada uma das toxinas. Pode-se recorrer à pesquisa de citotoxicidade em culturas de células vero, células Caco-2 (Wjinands *et al.*, 2005), células CHO e células McCoy (Arnesen *et al.*, 2008).

A reacção de polimerização enzimática em cadeia (PCR) constitui um método bastante fiável para identificar a presença dos genes que codificam as enterotoxinas. Contudo, a presença dos genes não determina que a bactéria efectivamente produza a enterotoxina.

Em suma, não existe nenhum teste que nos permita ao mesmo tempo demonstrar qual a enterotoxina presente numa determinada estirpe e se essa mesma estirpe é efectivamente enterotóxica. Apenas é possível determinar se uma dada estirpe é ou não potencialmente patogénica.

III. Pesquisa de enterotoxinas em isolados do grupo *Bacillus cereus*

1. Material e métodos

1.1. Selecção das estirpes

As estirpes foram seleccionadas a partir da colecção de bactérias do grupo *B. cereus* do LBDBE. Foram isoladas 75 estirpes a partir de alimentos recolhidos para análise entre 2006 e 2009. No Anexo 1 é indicada a proveniência de cada uma das estirpes.

As estirpes de bactérias utilizadas neste estudo foram identificadas pelas metodologias referenciadas em norma internacional (ISO 21871:2006) como pertencendo ao grupo *B. cereus*.

1.1.1. Caracterização das estirpes seleccionadas

Para confirmar que todas as estirpes utilizadas neste estudo pertencem ao grupo *B. cereus*, as bactérias foram isoladas em meio MYP (LBDBE) e incubadas a 30°C durante 24 horas de acordo com a ISO 21871:2006, para avaliar a sua capacidade de fermentar o manitol. Este meio, devido a ser constituído por gema de ovo permite avaliar a presença ou ausência de lecitinase nas estirpes analisadas. Seguidamente e, de modo a caracterizar com maior profundidade cada uma das estirpes, foi realizado o perfil bioquímico de cada uma, utilizando a galeria API CH[®] (Biomérieux, França).

Para a realização das galerias API CH[®] cada uma das estirpes foi isolada em PCA (*Plate Count Agar*; LBDBE) e incubadas a 30°C durante 24 horas. Retirou-se com uma ansa várias colónias idênticas e, utilizando o ATB[®] Densitómetro, preparou-se uma suspensão no meio CHB (Biomérieux, França), de turvação equivalente a 2 na escala de McFarland. Posteriormente preencheu-se os pocilhos da galeria com a suspensão anteriormente descrita. Colocaram-se as galerias API 50 CH[®] a incubar a 30°C durante 48 horas, tendo sido realizada a leitura dos resultados às 24 e às 48 horas. Os dados obtidos foram introduzidos no software APIweb[®] da Biomérieux obtendo-se assim a identificação ao nível espécie para cada estirpe. A partir da leitura das galerias API foi também possível verificar quais as estirpes que hidrolisavam o amido.

O isolamento das estirpes em PCA permitiu também verificar quais apresentavam crescimento rizóide.

Para além do isolamento em MYP e em PCA e do perfil bioquímico, cada uma das estirpes foi isolada em agar sangue 5% (LBDBE) para avaliar a presença ou ausência de hemólise (incubação a 30°C durante 24 horas, ISO 21871:2006).

1.2. Extracção e Purificação de ADN

Os isolados foram inoculados em placas de PCA e incubados a 30° C durante 24 horas. Foram colhidas as colónias em estudo com uma ansa (de 10 µl), suspendendo-se em TE (Tris EDTA; Sigma Portugal) pH 8.0 e homogeneizando até se obter uma densidade óptica de 1 a 600nm (leitura no espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000). De seguida, transferiram-se 740 µl desta suspensão para um tubo Eppendorf e adicionaram-se 20 µl de lisozima (100 mg/ml em 10 mM Tris Cl pH 8.0; Sigma, Portugal) incubando-se a suspensão durante 15 minutos a 37° C. Adicionou-se 40 µl de 10% SDS, misturando suavemente, e aguardaram-se 10 minutos. Findo o tempo, adicionaram-se 8 µl de proteinase K (20 mg/ml em 50 mM Tris HCl pH 8.0, concentração final 200 µg/ml; Sigma, Portugal) e deixou-se a incubar durante 1 hora a 55°C. Seguidamente, procedeu-se à incubação a 80° C durante 15 min para inactivar a proteinase K, após o que se adicionaram 200 µl 5M NaCl (concentração final 1 M) misturando suavemente e ficando a solução em gelo durante 1 hora. Por último foi feita a remoção dos resíduos bacterianos por centrifugação a 15000 rpm (rotações por minuto) a 4° C, colhendo-se o sobrenadante que foi transferido para um tubo Eppendorf.

Para a purificação do ADN realizou-se a extracção em fenol:clorofórmio, adicionando um volume igual de fenol:clorofórmio:álcool iso-amil (25:24:1; Sigma, Portugal) ao sobrenadante obtido anteriormente. Procedeu-se à homogeneização, em vórtex, até se formar uma emulsão e esta foi centrifugada a 14500 rpm durante 3 minutos a 4°C. Descartou-se a fase orgânica, transferindo a fase aquosa para um tubo Eppendorf e repetiu-se o passo anterior mas utilizando apenas clorofórmio (J. T. Baker, Holanda). Transferiu-se novamente a fase aquosa para um tubo Eppendorf e adicionaram-se 3 volumes de isopropanol (Sigma, Portugal), homogeneizando a mistura e deixando-a à temperatura ambiente, em repouso, durante 1 hora. No final deste tempo recuperou-se o ADN através de centrifugação a 14500 rpm durante 20 minutos a 4° C, descartou-se o isopropanol e deixou-se secar o *pellet* à temperatura ambiente. Uma vez seco, ressuspendeu-se o *pellet* em TE pH 8,0, ficando esta solução congelada a -18° C.

1.3. Confirmação da presença de ADN

Após a extracção, foi confirmada a presença de ADN, bem como do seu grau de pureza, através do uso do espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 (Thermo Scientific, Estados Unidos da América). Nas situações de ausência de ADN em quantidades mensuráveis ou de baixa pureza, procedeu-se novamente à respectiva extracção.

1.4. PCR em tempo real

A pesquisa dos genes que codificam as enterotoxinas de *B. cereus sensu stricto* realizou-se por PCR em tempo real. O PCR foi realizado em placas de 96 poços (PCR plates 96 well BioRad®), selada com tampas de plástico (Flat cap strips BioRad®). Depositou-se em cada poço 20 µl da solução de reacção composta por 10 µl de iQ SYBR Green Supermix (BioRad®; 100 mM KCl; 40 mM Tris-HCl, pH 8,4; 0,4 mM de cada dNTP [dATP, dCTP, dGTP e dTTP]; iTaq DNA polimerase, 50 unidades/ml; 6mM MgCl₂; Sybr Green I, 20 nM fluoresceína), 2 µl do *primer forward*, 2 µl do *primer reverse*, 3 µl de água ultra pura e 3 µl da solução de trabalho do ADN a pesquisar. Como controlo da reacção utilizaram-se *primers* universais para o gene ADNr 16S, como controlo positivo utilizou-se a estirpe *B. cereus* ATCC 7064 (gentilmente fornecida pelo INSA Dr. Ricardo Jorge) e como controlo negativo da reacção adicionaram-se 3 µl de água ultra pura em vez do ADN alvo. Foi ainda utilizado um poço com 20 µl de água ultra pura como branco. Os *primers* utilizados, com base em trabalhos já publicados, foram sintetizados pela Invitrogen™ e estão listados na Tabela 6. O PCR em tempo real foi realizado no ICycler IQ5 (BioRad®) segundo os seguintes protocolos:

- ⇒ Para o gene *hblA*: 3 minutos de desnaturação a 95 °C; 35 ciclos de amplificação com 30 segundos de desnaturação a 95° C, 45 segundos de hibridação a 45° C e 1 minuto e 30 segundos de extensão a 72° C; e 201 ciclos de fusão, de 10 segundos cada, com uma curva a variar entre os 55 e os 95° C com incremento de 0,2° C;
- ⇒ Para o gene *hblB*: 3 minutos de desnaturação a 95 °C; 35 ciclos de amplificação com 30 segundos de desnaturação a 95° C, 45 segundos de hibridação a 55° C e 3 minutos de extensão a 72° C; e 201 ciclos de fusão, de 30 segundos cada, com uma curva a variar entre os 55 e os 95° C com incremento de 0,2° C;
- ⇒ Para os genes de ADN 16S, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytK*, *bceT*: 3 minutos de desnaturação a 95 °C; 35 ciclos de amplificação com 30 segundos de desnaturação a 95° C, 50 segundos de hibridação a 55° C e 1 minuto de extensão a 72° C; e 201 ciclos de fusão com uma curva a variar entre os 55 e os 95° C com incremento de 0,2° C.

Tabela 6 – *Primers* utilizados na pesquisa de enterotoxinas *B. cereus*.

Sequência alvo	<i>Primers</i> no sentido 5'-3'		Fragmento amplificado (pb)	Temperatura de <i>melting</i> (°C)	G+C (%)	Fonte
Gene ADNr 16S	F	ATTAGATACCCTDGTAGTCC	721	87	53	Kuske <i>et al.</i> , 1998
	R	TACCTTGTTACGACTT				
Gene <i>hblA</i>	F	AAGCAATGGAATACAATGGG	1154	82	34	Guinebretière <i>et al.</i> , 2002
	R	AGAATCTAAATCATGCCACTGC				
Gene <i>hblB</i>	F	AAGCAATGGAATACAATGGG	2684	81	32	Guinebretière <i>et al.</i> , 2002
	R	AATATGTCCCAGTACACCCG				
Gene <i>hblC</i>	F	GATAC(T, C)AATGTGGCAACTGC	740	82	31	Guinebretière <i>et al.</i> , 2002
	R	TTGAGACTGCTCG(T, C)TAGTTG				
Gene <i>hblD</i>	F	ACCGGTAACACTATTCATGC	829	83	36	Guinebretière <i>et al.</i> , 2002
	R	GAGTCCATATGCTTAGATGC				
Gene <i>nheA</i>	F	GTTAGGATCACAATCACCGC	755	82	33	Guinebretière <i>et al.</i> , 2002
	R	ACGAATGTAATTTGAGTCGC				
Gene <i>nheB</i>	F	TTTAGTAGTGGATCTGTACGC	743	83	37	Guinebretière <i>et al.</i> , 2002
	R	TTAATGTTCGTTAATCCTGC				
Gene <i>nheC</i>	F	TGGATTCCAAGATGTAACG	683	82	34	Guinebretière <i>et al.</i> , 2002
	R	ATTACGACTTCTGCTTGTGC				
Gene <i>cytK</i>	F	ACAGATATCGG(G, T)CAAAATGC	809	82	36	Guinebretière <i>et al.</i> , 2002
	R	GAAGT(G, C)(A, T)AACTGGGTTGGA				
Gene <i>bceT</i>	F	CGTATCGGTCGTTCACTCGG	661	82	34	Guinebretière <i>et al.</i> , 2002
	R	GTTGATTTTCCGTAGCCTGGG				

1.4.1. Critério de análise dos resultados

O PCR em tempo real utiliza na solução de reacção um corante ou sonda fluorescente, os quais se ligam aos produtos sintetizados na reacção, permitindo a sua detecção e quantificação durante a progressão dos ciclos de reacção. Neste trabalho foi utilizado o SYBR Green, um corante intercalante do ADN que se une às cópias de ADN sintetizadas em cada ciclo sucessivo, aumentando a fluorescência com a quantidade de ADN sintetizado. O ciclo no qual a reacção atinge uma intensidade de fluorescência superior ao valor base é chamado ciclo *threshold* ou limiar. Existe uma relação linear entre o ciclo *threshold* e a quantidade de ADN presente na amostra, o que torna o PCR em tempo real um método quantitativo (Sachse & Frey).

Algumas vantagens do PCR em tempo real, em relação ao PCR convencional, são a sua elevada sensibilidade, com a utilização da sonda ou corante apropriados, a sua capacidade de detectar quantidades relativamente pequenas de ADN alvo e a facilidade de quantificação, uma vez que não há processamento pós-PCR. A desvantagem do PCR em tempo real utilizando corante interligante é que este se pode ligar a qualquer produto de

dupla cadeia, incluindo dímeros *de primers*² e produtos de amplificação não específicos, e dar origem a fluorescência (Sachse & Frey). Para compensar esta ligação não específica do corante, o equipamento de PCR tem a capacidade de correr uma curva de *melting* após o PCR, que consiste em aumentos sucessivos da temperatura nos poços da reacção até haver perda da fluorescência devido à desnaturação do ADN. Quando se atinge a temperatura de *melting* da sequência alvo observa-se uma quebra abrupta da fluorescência; se se observarem diminuições adicionais da fluorescência pode significar que ocorreu contaminação, ou os parâmetros do PCR podem não ter sido suficientemente específicos. A temperatura de *melting* de cada produto de amplificação depende do seu conteúdo em guanina e citosina (GC), comprimento e características da sequência, o que permite então distinguir diferentes produtos de PCR. No PCR efectuado neste trabalho, é esperado que as amostras positivas apresentem um aumento exponencial da fluorescência após o ciclo *threshold* (Sachse & Frey).

Uma vez que as amostras de ADN não foram todas processadas simultaneamente foi efectuado um PCR em tempo real após a extracção de ADN num total de 14 reacções. Para cada PCR efectuado é mostrada uma tabela com as temperaturas de *melting* apenas das estirpes consideradas positivas ou duvidosas.

1.5. Electroforese de ADN em gel

De modo a confirmar os resultados obtidos no PCR em tempo real pesquisou-se o tamanho do fragmento amplificado, em cada gene alvo, por electroforese de ADN em gel. A electroforese foi realizada para as estirpes positivas.

Em primeiro lugar preparou-se o gel de agarose a 1,5%, adicionando 2,25 g de Certified™ PCR agarose (BioRad) a 150 ml de Tris-Borato (TBE) 0,5 M. Aqueceu-se a solução no microondas até o conteúdo ficar transparente. Deixou-se arrefecer a solução juntando-se, posteriormente, 15 µl de brometo de etídeo (Sigma, Portugal). Transferiu-se o gel para um molde e deixou-se arrefecer até solidificar. Entretanto, transferiu-se 2L de TBE 0.5 M para a tina de electroforese e colocou-se o gel na tina. A cada produto da reacção do PCR em tempo real adicionou-se 4 µl de orange G (Sigma, Portugal).

No primeiro e último pocilhos adicionou-se 10 µl do ladder (de 3000 pb; Sigma, Portugal) e nos restantes as amostras em estudo (10µl), o controlo positivo (10µl), o controlo de reacção

² Dímeros *de primers* – artefacto originado pela interacção de dois primers durante a fase de extensão do PCR, com subsequente formação de um produto de PCR pela extensão a partir da extremidade 3' de um ou de ambos os primers.

(10 μ l) e o branco (10 μ l). A corrida de electroforese ocorreu a 80 volts/400 mAmp durante aproximadamente 3 horas.

No final da electroforese colocou-se o gel no transiluminador (BioRad) e procedeu-se à leitura dos resultados.

1.6. Alinhamento das sequências nucleotídicas

De modo a investigar a variabilidade dos genes que codificam as enterotoxinas, procedeu-se ao alinhamento de várias sequências nucleotídicas. Em primeiro lugar, seleccionaram-se as sequências de várias estirpes que expressam os genes que codificam as enterotoxinas. Estas sequências foram seleccionadas a partir da base de dados *GenBank*, do *National Center for Biotechnology Information* e foram guardadas em ficheiros FASTA. Posteriormente, utilizando o programa clustal W2 (www.ebi.ac.uk) procedeu-se ao alinhamento das sequências de nucleótidos, para cada gene, verificando se existiam zonas não conservadas ou se se tratava de um gene altamente conservado. Foi também calculada a temperatura de *melting* de cada sequência alvo em estudo.

IV. Resultados

1. Caracterização dos isolados do grupo *B. cereus* em estudo

A Tabela 7 revela os resultados obtidos de diferentes testes realizados a partir do isolamento em MYP, PCA e em agar sangue (5%), bem como os resultados do perfil bioquímico.

Tabela 7 – Resultados da caracterização fenotípica das estirpes utilizadas neste estudo.

Legenda: +, positivos; +/-, fracamente positivos; -, negativos.

Estirpe	Lecitinase	Manitol	Crescimento rizóide	Hemólise	Hidrólise do amido	API 50 CH®	
						% ID	Resultado
J4	+	-	-	+	+	61,1	<i>B. mycoides</i>
J238	+	-	-	+	+	88,5	<i>B. mycoides</i>
J239	+	-	-	+	+	88,5	<i>B. mycoides</i>
J240	+	-	+	+	+	88,5	<i>B. mycoides</i>
J241	+	-	-	+	+	47,7	<i>B. cereus</i>
J242	+	-	-	+	+	47,7	<i>B. cereus</i>
J243	+	-	-	+	+	88,5	<i>B. mycoides</i>
J244	+	-	-	+	-	88	<i>B. cereus</i>
J245	+	-	-	+	+	63,4	<i>B. cereus</i>
J246	+	-	-	+	+	71,9	<i>B. mycoides</i>
J247	+	-	-	+	+	47,4	<i>B. mycoides</i>
J248	+	-	-	+	-	73,7	<i>B. cereus</i>
J249	+	-	-	+	-	30,5	<i>B. cereus</i>
J250	+	-	-	+	+	87,8	<i>B. mycoides</i>
J251	+	-	-	+	+	88,5	<i>B. mycoides</i>
J252	+	-	-	+	+	88,5	<i>B. mycoides</i>
J253	+	-	-	+	-	79,8	<i>B. cereus</i>
J254	+	-	-	+	+	40	<i>B. mycoides</i>
J255	+	-	-	+	+	78,9	<i>B. cereus</i>

Tabela 7 (continuação)

Estirpe	Lecitinase	Manitol	Crescimento rizóide	Hemólise	Hidrólise do amido	API 50 CH®	
						% ID	Resultado
J256	+	-	-	+	+	78,9	<i>B. cereus</i>
J257	+	-	-	+	+	88,5	<i>B. mycoides</i>
J258	+	-	-	+	+	88,5	<i>B. mycoides</i>
J259	+	-	-	+	+	60,9	<i>B. mycoides</i>
J260	+	-	-	+	+	88,5	<i>B. mycoides</i>
J262	+	-	-	+	+	41,2	<i>B. mycoides</i>
J263	+	-	-	+	+	61,1	<i>B. mycoides</i>
J264	+	-	+	-	+	81,9	<i>B. cereus</i>
J266	+	-	-	+	-	88	<i>B. cereus</i>
J269	+	-	-	+	+	81,9	<i>B. cereus</i>
J270	+	-	-	+	+	47,4	<i>B. mycoides</i>
J271	+	-	-	+	-	72,4	<i>B. cereus</i>
J272	+	-	-	+	+	61,1	<i>B. mycoides</i>
J273	+	-	-	+	+	75,8	<i>B. cereus</i>
J274	+	-	-	+	-	60,4	<i>B. cereus</i>
J280	+	-	-	+	+	71,9	<i>B. mycoides</i>
J281	+	-	-	+/-	-	87,4	<i>B. cereus</i>
J285	+	-	-	-	-	99,6	<i>B. cereus</i>
J286	+	-	-	+	-	68,8	<i>B. cereus</i>
J287	+	-	-	+	-	72,4	<i>B. cereus</i>
J288	+	-	-	+	-	71,3	<i>B. cereus</i>
J289	+	-	-	+	-	77,4	<i>B. cereus</i>
J290	+	-	-	+	-	99,3	<i>B. cereus</i>
J293	+	-	-	+/-	+	88,5	<i>B. mycoides</i>
J294	+	-	-	+/-	+	90,8	<i>B. cereus</i>
J297	+	-	-	+	-	53,2	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
J298	+	-	-	+	+	93,7	<i>B. cereus</i>
J299	+	-	-	+	-	91,2	<i>B. cereus</i>
J300	+	-	-	+	-	88	<i>B. cereus</i>

Tabela 7 (continuação)

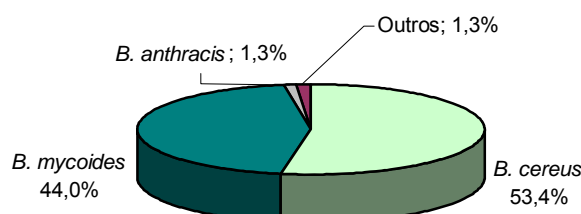
Estirpe	Lecitinase	Manitol	Crescimento rizóide	Hemólise	Hidrólise do amido	API 50 CH [□]	
						% ID	Resultado
J301	+	-	-	+/-	+	61,1	<i>B. mycoides</i>
J302	+	-	-	+	-	90,3	<i>B. cereus</i>
J303	+	-	-	+	+	40	<i>B. mycoides</i>
J304	+	-	-	+	+	88,5	<i>B. mycoides</i>
J305	+	-	-	+	+	81,9	<i>B. cereus</i>
J306	+	-	-	+	+	63,4	<i>B. cereus</i>
J307	+	-	-	+/-	+	88,5	<i>B. mycoides</i>
J308	+	-	-	+	+	71,9	<i>B. mycoides</i>
J309	+	-	-	+	+	88,5	<i>B. mycoides</i>
J310	+	-	+	-	+	65,3	<i>B. cereus</i>
J311	+	-	-	+	+	62,8	<i>B. cereus</i>
J312	+	-	-	+	-	87,4	<i>B. cereus</i>
J313	+	-	-	+	+	51,9	<i>B. mycoides</i>
J314	+	-	-	+	-	67,4	<i>B. cereus</i>
J315	+	-	-	+	+	47,7	<i>B. cereus</i>
J316	+	-	-	+	-	87,4	<i>B. cereus</i>
J317	+	-	-	+	-	72,4	<i>B. cereus</i>
J318	+	-	-	+	-	87,4	<i>B. cereus</i>
319	+	-	-	+	+	88,5	<i>B. mycoides</i>
320	+	-	-	+	+	69,5	<i>B. mycoides</i>
321	+	-	-	+	+	61,1	<i>B. mycoides</i>
322	+	-	-	+	-	72,4	<i>B. cereus</i>
323	+	-	-	+	-	77,3	<i>B. anthracis</i>
324	+	-	-	+	+	47,7	<i>B. cereus</i>
325	+	-	-	+	+	88,5	<i>B. mycoides</i>
326	+	-	-	+	+	65,3	<i>B. cereus</i>
J327	+	-	-	+	+	71,9	<i>B. mycoides</i>
Total positivos	75	0	3	67	51		

Após o isolamento das estirpes em meio MYP verificou-se que a morfologia de todas as colônias isoladas era idêntica, com colônias de coloração rosa rodeadas de um halo. Nenhuma das placas apresentava coloração amarela.

No meio PCA foi analisada, com pormenor, a morfologia das colônias obtidas. Dos 75 isolados, 3 apresentavam crescimento rizóide: estirpes J240, J264 e J310.

O estudo do perfil bioquímico mostra que, dentro das 75 estirpes analisadas, 40 pertencem à espécie *B. cereus* (53,4%), 33 a *B. mycoides* (44,0%) e uma única estirpe a *B. anthracis* (1,3%). A Figura 8 mostra a distribuição das estirpes analisadas pelas espécies do grupo *B. cereus*. A estirpe J297 foi fracamente identificada (%ID=53,2%) como *Brevibacillus laterosporus*.

Figura 8 – Distribuição das estirpes isoladas pelas espécies do grupo *B. cereus*.



Através da análise do perfil bioquímico foi possível diferenciar as estirpes que metabolizam o amido das que não possuem essa capacidade. Assim, das 75 estirpes utilizadas neste trabalho 50 hidrolisam o amido (66,7%), enquanto que 25 não (33,3%).

Em relação à pesquisa de hemólise nos isolados do grupo *B. cereus* (Figura 9), verificou-se que 67 estirpes eram hemolíticas (89,3%), 5 fracamente hemolíticas (6,7%) e três estirpes não revelaram hemólise (4,0%).

Figura 9 – Hemólise das estirpes do grupo *B. cereus*.



2. Pesquisa de enterotoxinas em isolados do grupo *B. cereus*

Considerando o elevado número de genes alvo e de estirpes analisadas, para cada gene pesquisado por PCR em tempo real é mostrado apenas um exemplo dos resultados obtidos (tabela das curvas de *melting* e curvas de amplificação e de *melting*). Todos os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 17.

2.2. Pesquisa do gene *hblA*

As curvas de amplificação obtidas a partir da leitura da reacção de PCR das estirpes J248, J249, J321-J327 encontram-se representadas na Figura 10. A Figura 11 mostra as curvas de *melting* correspondentes. A Tabela 8 indica as temperaturas de *melting* das estirpes amplificadas.

Figura 10 – Curvas de amplificação das estirpes J248, J249, J321-J327, controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

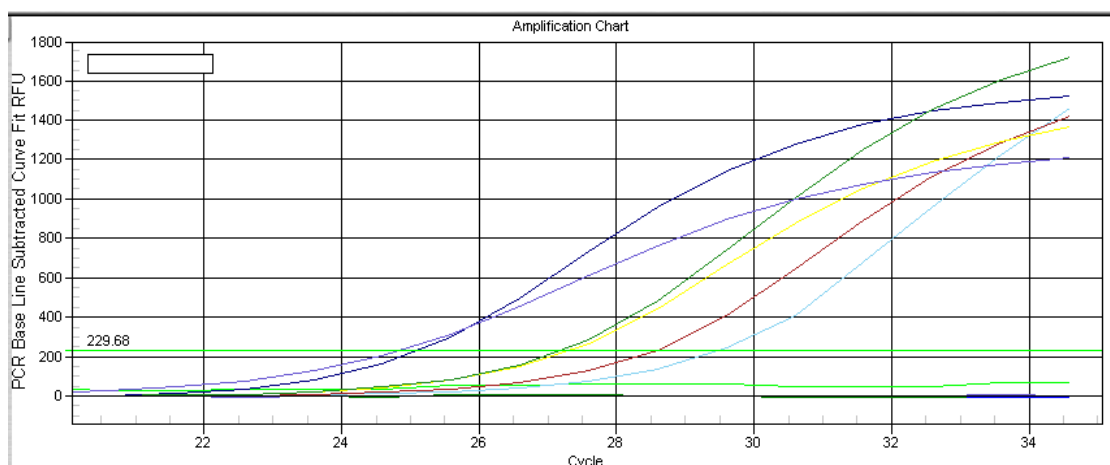


Figura 11 – Curvas de *melting* das estirpes J248, J249, J321-J327, controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

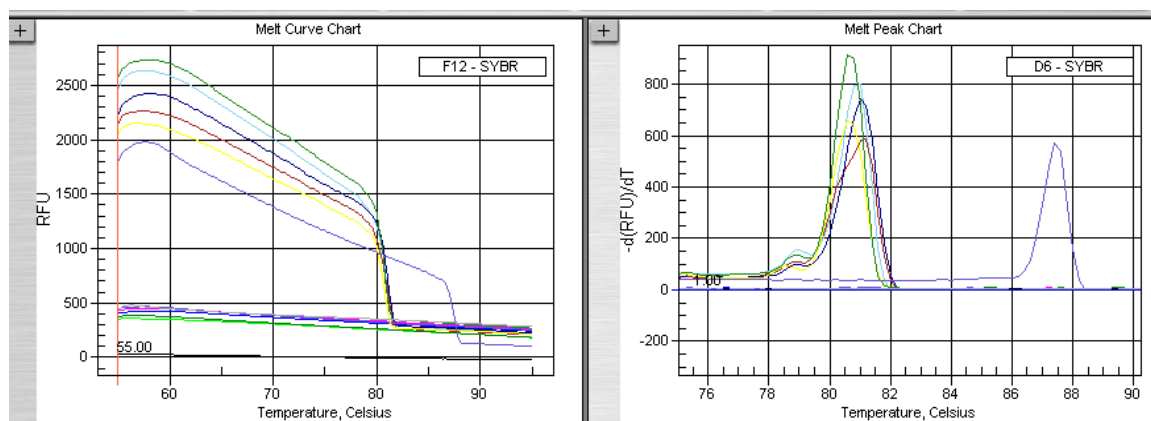
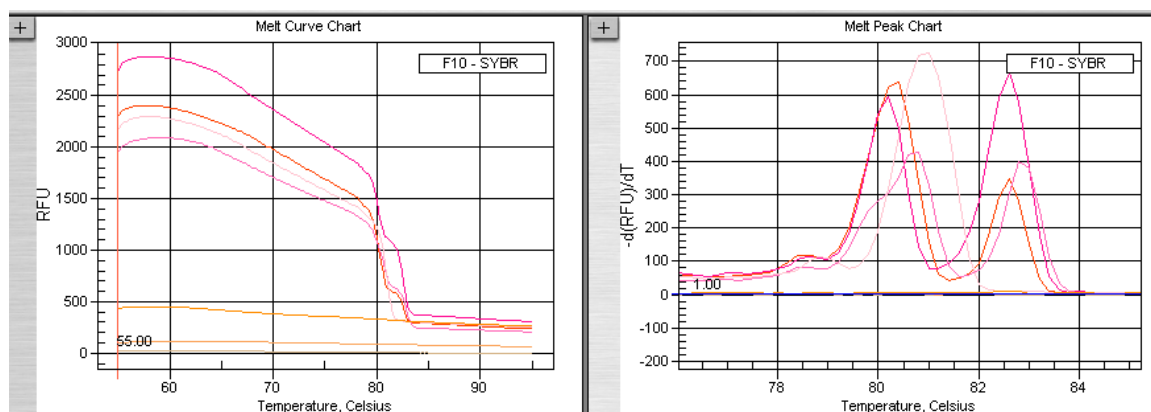


Tabela 8 – Temperaturas de *melting* das estirpes amplificadas e controlos positivo, negativo e branco.

Estirpe	Pico	Temperatura de <i>melting</i> (°C)	Tamanho do pico (-d.RFU/dt)
J321	A03.0	81,0	800,79
J324	A06.0	81,2	586,19
J325	A07.0	81,0	741,89
J327	A09.0	80,6	658,71
C. Positivo	A10.0	80,6	915,74
C. Reacção	D03.0	87,4	573,54
C. negativo	D06.0	56,8	13,44
Branco	D12.0	61,4	2,45
	D12.1	65,6	2,39
	D12.2	68,4	2,65
	D12.3	76,6	2,55
	D12.4	78,0	2,55
	D12.5	79,8	2,20
	D12.6	86,2	2,94
	D12.7	87,2	1,87
	D12.8	89,4	2,39
	D12.9	91,4	2,14
	D12.10	93,8	1,82

A análise das Figuras 10, 11 e da Tabela 8 revela que as estirpes J321 ($T_m=81^{\circ}\text{C}$), J324 ($T_m=81,2^{\circ}\text{C}$) e J325 ($T_m=81^{\circ}\text{C}$) expressam o gene *hblA*, com curvas de amplificação típicas e temperaturas de *melting* dentro do intervalo esperado ($82^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$). A estirpe J327 foi considerada também considerada positiva, uma vez que apresentou uma temperatura de *melting* idêntica à estirpe do controlo positivo.

Em algumas reacções foram obtidas curvas de *melting* com dois ou mais picos (Figura 12), sendo essas estirpes consideradas duvidosas.

Figura 12 – Curvas de *melting* das estirpes J251, J252, J254, J255.

2.2. Pesquisa do gene *hblB*

Todas as estirpes testadas para o gene *hblB* revelaram-se negativas, não se tendo verificado nenhuma amplificação para além do controlo positivo.

2.3. Pesquisa do gene *hblC*

As curvas de amplificação obtidas a partir da leitura da reacção de PCR das estirpes J248, J249, J321-J327 encontram-se representadas na Figura 13. A Figura 14 mostra as curvas de *melting* correspondentes. A Tabela 9 indica as temperaturas de *melting* das estirpes amplificadas.

Figura 13 – Curvas de amplificação das estirpes J248, J249, J321-J327, controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

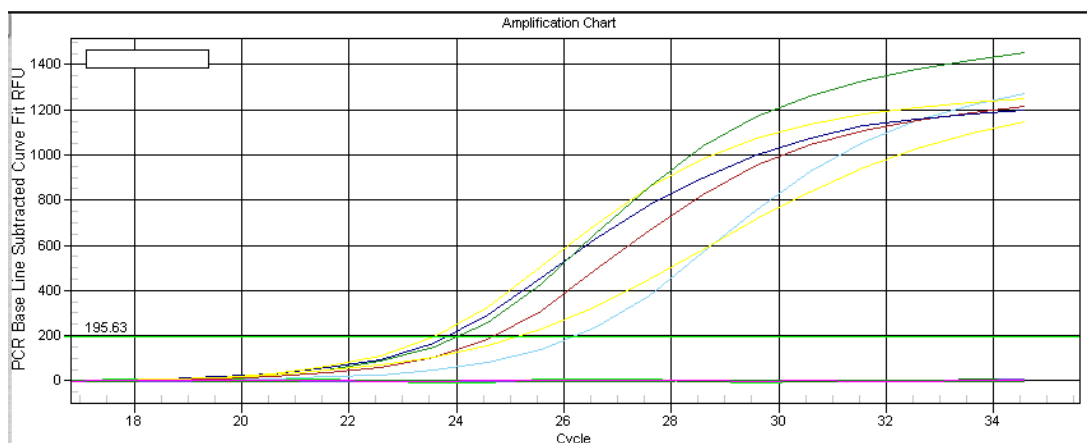


Figura 14 – Curvas de *melting* das estirpes J248, J249, J321-J327, controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

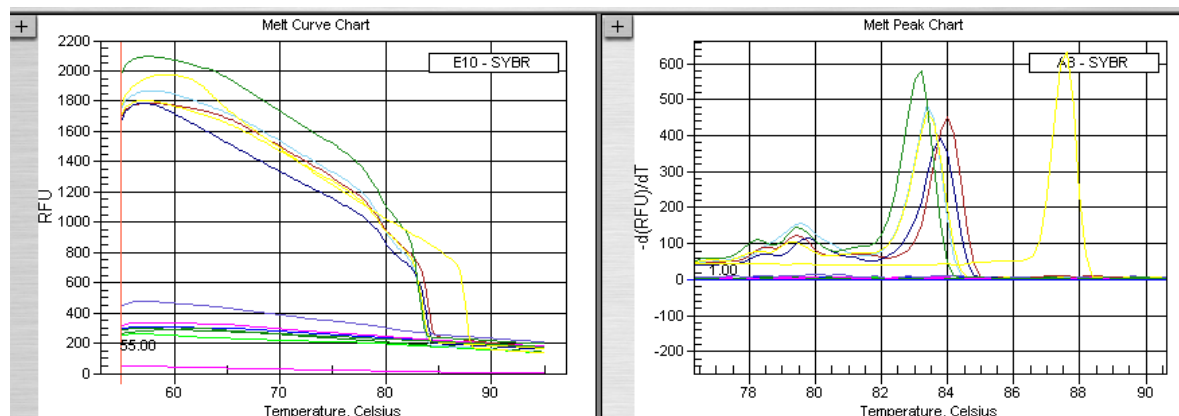


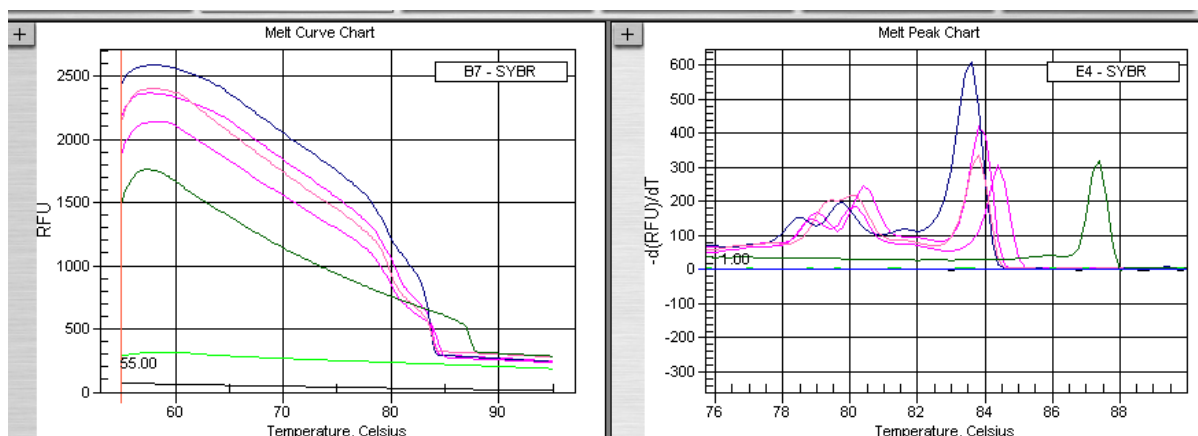
Tabela 9 – Temperaturas de *melting* das estirpes amplificadas e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

Estirpe	Pico	Temperatura de <i>melting</i> (°C)	Tamanho do pico (-d.RFU/dt)
J321	A03.0	83,4	484,75
J324	A06.0	84,0	453,25
J325	A07.0	83,8	392,16
J327	A09.0	83,4	462,40
C. Positivo	A10.0	83,2	578,63
C. Reacção	E11.0	87,6	633,09
C. Negativo	F03.0	59,8	15,54
	F03.1	60,6	13,34
Branco	F05.0	64,8	3,14
	F05.1	68,4	2,45
	F05.2	70,4	3,70
	F05.3	72,4	3,76
	F05.4	84,8	2,48
	F05.5	91,6	3,82

A análise das Figuras 13 e 14 e da Tabela 9 revela que todas as estirpes são duvidosas pois todos os respectivos produtos de amplificação possuem temperatura de *melting* fora do intervalo considerado positivo ($82^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). No entanto, as temperaturas observadas foram muito próximas da apresentada pelo produto de amplificação da estirpe utilizada como controlo positivo.

Em algumas reacções foram obtidas curvas de *melting* com dois ou mais picos (Figura 15), sendo essas estirpes consideradas duvidosas.

Figura 15 – Curvas de *melting* das estirpes J273, J280, J293, J294.



2.4. Pesquisa do gene *hblD*

Algumas das estirpes que apresentaram amplificação para o gene *hblD* são a J248, J249, J321-J327. A Figura 16 mostra as curvas de amplificação destas estirpes e a Figura 17 as curvas de *melting* correspondentes. Na Tabela 10 estão indicadas as temperaturas de *melting* das estirpes amplificadas.

Figura 16 – Curvas de amplificação das estirpes J248, J249, J321-J327, controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

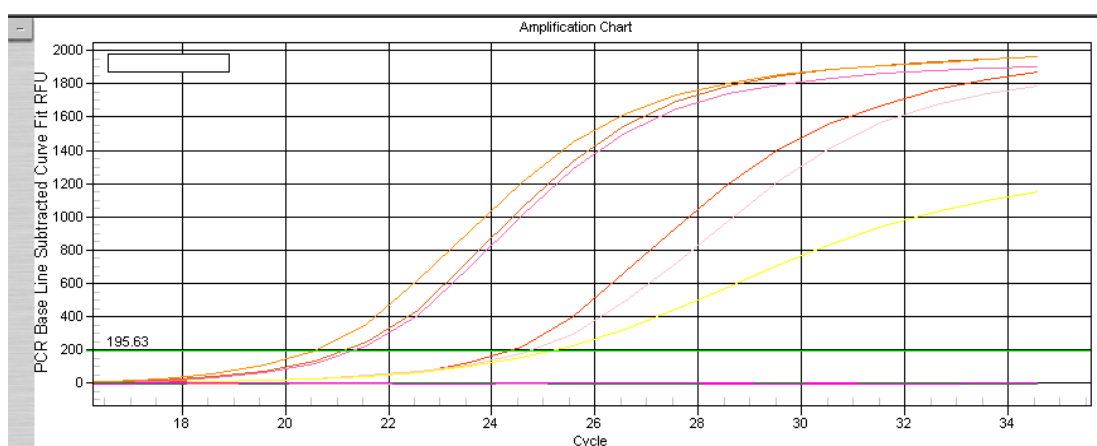


Figura 17 – Curvas de *melting* das estirpes J248, J249, J321-J327, controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

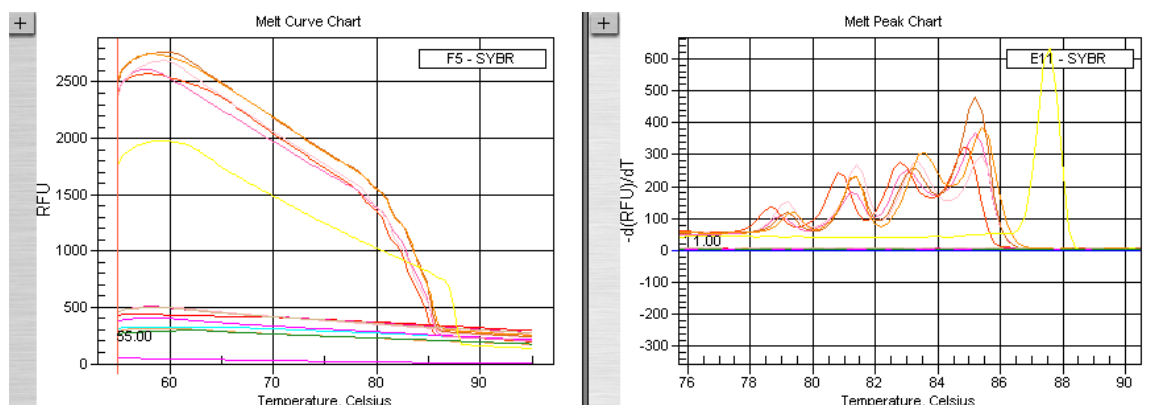


Tabela 10 – Temperaturas de *melting* das estirpes amplificadas e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

Estirpe	Pico	Temperatura de <i>melting</i> (°C)	Tamanho do pico (-d.RFU/dt)
J321	B01.0	78,6	136,80
J321	B01.1	80,8	241,77
J321	B01.2	82,8	275,19
J321	B01.3	84,8	322,83
J324	B04.0	81,2	180,33
J324	B04.1	83,0	252,06
J324	B04.2	85,2	367,28
J325	B05.0	79,2	151,27
J325	B05.1	81,4	269,04
J325	B05.2	83,4	276,10
J325	B05.3	85,4	296,11
J327	B07.0	81,4	231,92
J327	B07.1	83,2	259,30
J327	B07.2	85,2	479,81
C. Positivo	B08.0	81,4	229,26
	B08.1	83,6	304,66
	B08.2	85,4	382,53
C. Reacção	E11.0	87,6	633,09
C. Negativo	F03.0	59,8	15,54
	F03.1	60,6	13,34
Branco	F05.0	64,8	3,14
	F05.1	68,4	2,45
	F05.2	70,4	3,70
	F05.3	72,4	3,76
	F05.4	84,8	2,48
	F05.5	91,6	3,82

Através da análise das Figuras 16 e 17 e da Tabela 10, verifica-se que todas as estirpes apresentam vários picos de *melting*, pelo que foram consideradas duvidosas para a expressão do gene *hblD*. Este padrão foi também observado no controlo positivo, que apresentava três picos na curva de *melting*.

2.5. Pesquisa do gene *nheA*

As curvas de amplificação obtidas a partir da leitura da reacção de PCR das estirpes J281, J290, J293, J302, J310, J248, J249, J321-J327 encontram-se representadas na Figura 18. A Figura 19 mostra as curvas de *melting* correspondentes. A Tabela 11 indica as temperaturas de *melting* das estirpes amplificadas.

Figura 18 – Curvas de amplificação das estirpes J281, J290, J293, J302, J310, J248, J249, J321-J328, controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

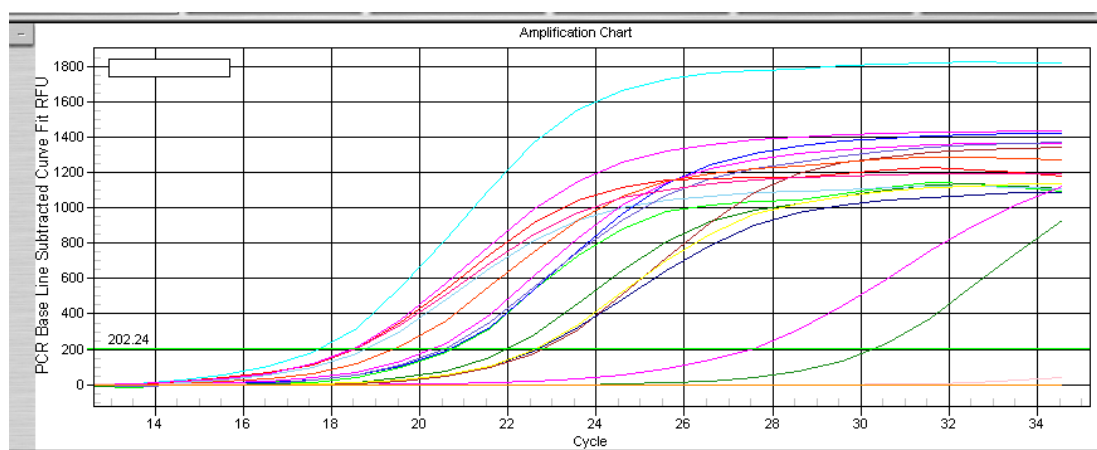


Figura 19 – Curvas de *melting* das estirpes J281, J290, J293, J302, J310, J248, J249, J321-J328 e controlos positivo, negativo e branco.

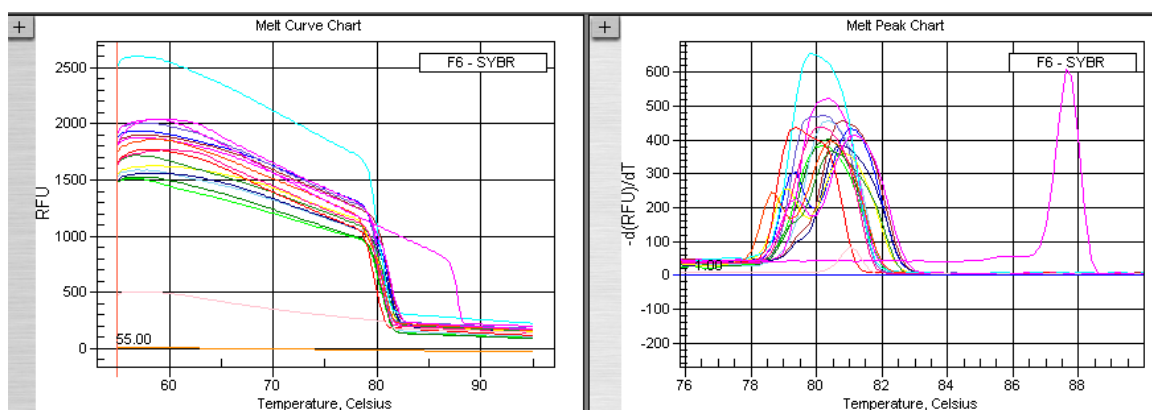


Tabela 11 – Temperaturas de *melting* das estirpes amplificadas e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

Estirpe	Pico	Temperatura de <i>melting</i> (°C)	Tamanho do pico (-d.RFU/dt)
J281	A01.0	80,2	383,67
J290	A02.0	80,4	403,88
J293	A03.0	80,4	458,17
J302	A04.0	79,4	303,53
J302	A04.1	81	435,14
J310	A05.0	80,4	524,84
J248	A06.0	80,8	457,36
J249	A07.0	80,8	384,69
J321	A09.0	80,2	471,83
J322	A10.0	79	254,66
J322	A10.1	80,8	361,98
J323	A11.0	80,4	366,30
J324	A12.0	79,8	657,07
J325	B01.0	79,4	438,49
J326	B02.0	78,6	245,98
J326	B02.1	80,4	399,14
J327	B03.0	80	436,25
C. Positivo	B04.0	79,4	228,95
	B04.1	81,2	414,50
C. Reacção	F05.0	87,6	524,05
C. Negativo	F10.0	58,8	11,51
	F10.1	62	7,09
	F10.2	63,6	7,46
	F10.3	79,2	7,85
Branco	F11.0	57,2	1,27
	F11.1	62,8	1,40
	F11.2	66,6	1,60
	F11.3	71,8	1,91
	F11.4	81,2	1,84
	F11.5	86,2	1,62
	F11.6	87,4	1,45

Através da análise das Figuras 18 e 19 e da Tabela 11 verificou-se que as estirpes J302, J322, J326, apesar de evidenciarem uma boa curva de amplificação, apresentam dois picos de *melting*, sendo por isso consideradas duvidosas. O controlo positivo também apresentava dois picos na curva de *melting*. As restantes estirpes apresentaram variações na temperatura de *melting*, sendo sempre inferiores aos 82°C (79-80,8°C), temperatura considerada positiva, e por isso, também não foram consideradas positivas para o gene *nheA*, mas sim duvidosas. Nas restantes reacções de PCR em tempo real verificaram-se resultados semelhantes.

2.6. Pesquisa do gene *nheB*

Algumas das estirpes que apresentaram amplificação para o gene *nheB* são a J248, J249, J321-J327. A Figura 20 mostra as curvas de amplificação destas estirpes e a Figura 21 as curvas de *melting* correspondentes. Na Tabela 12 estão indicadas as temperaturas de *melting* das estirpes amplificadas.

Figura 20 – Curvas de amplificação das estirpes J248, J249, J321-J327 e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

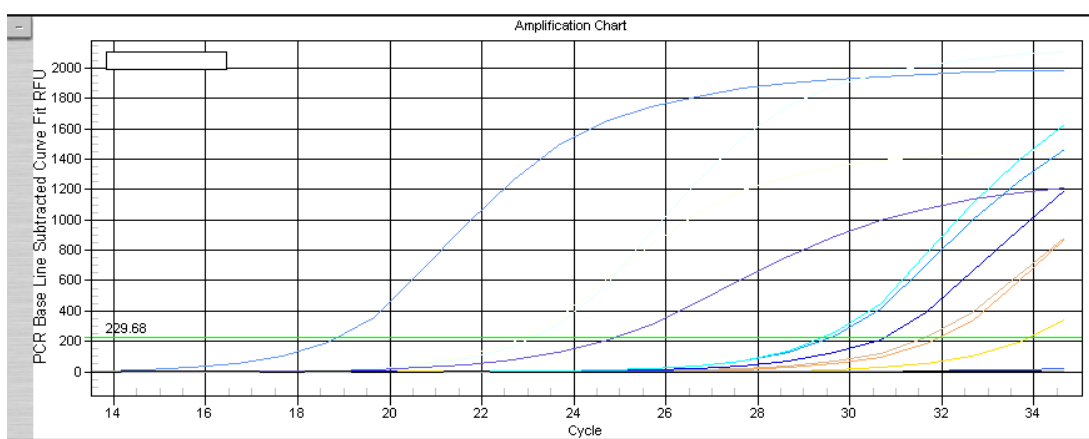


Figura 21 – Curvas de melting das estirpes J248, J249, J321-J327 e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

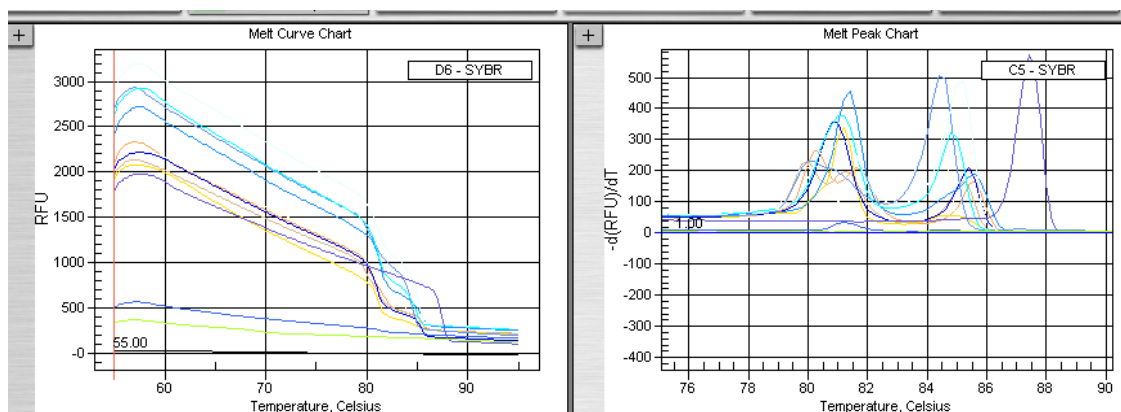


Tabela 12 – Temperaturas de *melting* das estirpes amplificadas e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

Estirpe	Pico	Temperatura de <i>melting</i> (°C)	Tamanho do pico (-d.RFU/dt)
J248	B09.0	80,2	265,84
J248	B09.1	81,6	209,93
J248	B09.2	85,6	168,69
J249	B10.0	80	230,95
J249	B10.1	81,2	198,03
J249	B10.2	85,2	166,44
J321	B11.0	79,8	209,60
J321	B11.1	84,2	370,65
J322	B12.0	81,2	340,17
J323	C01.0	80,8	357,52
J323	C01.1	85,4	208,02
J325	C03.0	80	230,19
J325	C03.1	84,4	504,78
J326	C04.0	81,4	454,76
J327	C05.0	81,2	378,73
J327	C05.1	84,8	323,41
C. Positivo	C06.0	81,2	292,35
	C06.1	85,2	491,00
C. Reacção	D03.0	87,4	573,54
C. Negativo	D07.0	57,6	46,85
	D07.1	59,2	35,22
	D07.2	61,2	24,84
Branco	D12.0	61,4	2,45
	D12.1	65,6	2,39
	D12.2	68,4	2,65
	D12.3	76,6	2,55
	D12.4	78	2,55
	D12.5	79,8	2,20
	D12.6	86,2	2,94
	D12.7	87,2	1,87
	D12.8	89,4	2,39
	D12.9	91,4	2,14
	D12.10	93,8	1,82

As estirpes incluídas na Tabela 12 apresentaram curvas de amplificação típicas. No entanto, só a estirpe J326 apresentou um único pico de *melting*, embora com uma temperatura de 81,4°C, inferior à esperada (83°C±1°C). As restantes estirpes apresentavam dois ou três picos na curva de *melting*, incluindo o controlo positivo.

Estes resultados verificaram-se em todas as estirpes com amplificação e por isso, todas as estirpes analisadas por PCR em tempo real para o gene *nheB* foram consideradas duvidosas.

2.7. Pesquisa do gene *nheC*

O PCR em tempo real das estirpes J257, J258, J262, J308, J310, J248, J249, J321-J327 originou as curvas de amplificação demonstradas na Figura 22. A Figura 23 mostra as curvas de *melting* das estirpes que amplificaram o gene *nheC*. A Tabela 13 indica os valores das temperaturas de *melting* das estirpes amplificadas.

Figura 22 – Curvas de amplificação das estirpes J257, J258, J262, J308, J310, J248, J249, J321-J327 e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

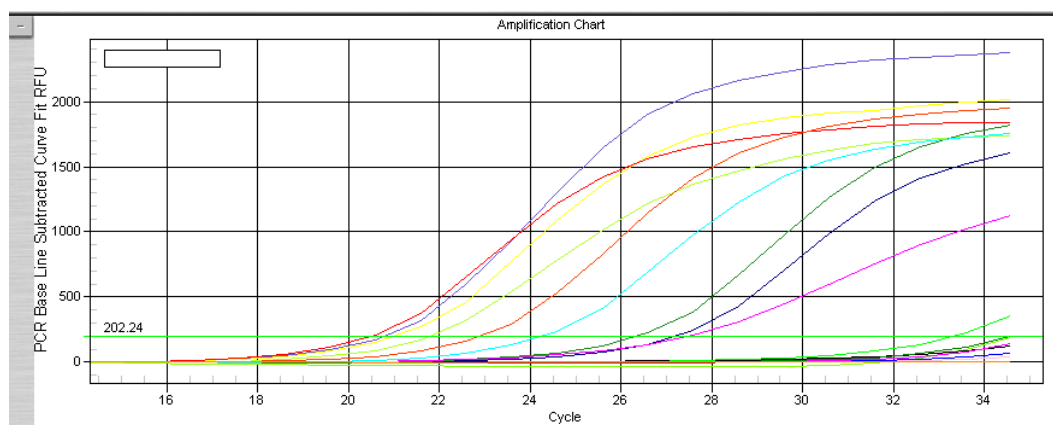


Figura 23 – Curvas de melting das estirpes J257, J258, J262, J308, J310, J248, J249, J321-J327 e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

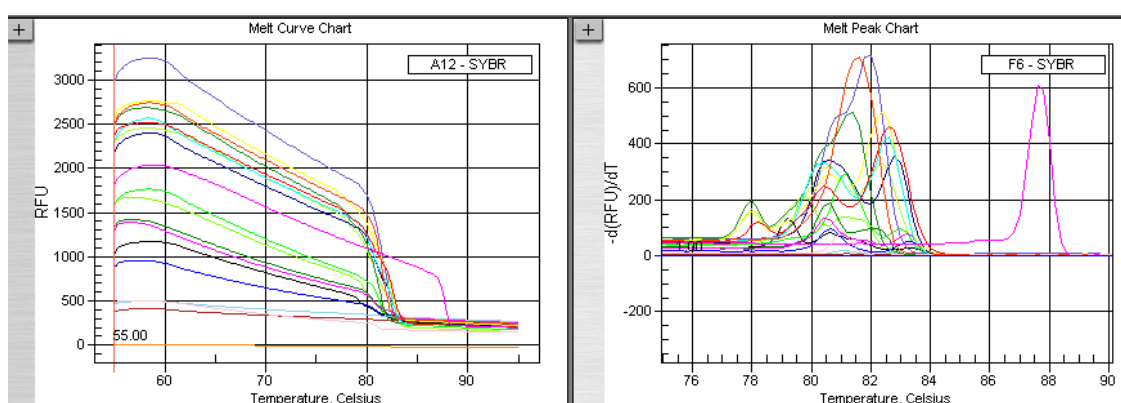


Tabela 13 – Temperaturas de *melting* das estirpes amplificadas e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

Estirpe	Pico	Temperatura de <i>melting</i> (°C)	Tamanho do pico (-d.RFU/dt)
J273	E01.0	78,00	166,35
J273	E01.1	80,60	320,12
J273	E01.2	82,40	327,94
J322	E10.0	80,6	343,67
J322	E10.1	82,8	356,79
J323	E11.0	82	716,14
J324	E12.0	80,6	290,34
J324	E12.1	82,4	516,84
J325	F01.0	78	196,73
J325	F01.1	81,4	511,06
J326	F02.0	80,4	332,34
J326	F02.1	82,6	423,26
J327	F03.0	80,4	249,07
J327	F03.1	82,6	463,48
C. Positivo	F04.0	81,6	710,37
C. Reacção	F05.0	87,6	524,05
C. Negativo	F10.0	58,8	11,51
	F10.1	62	7,09
	F10.2	63,6	7,46
	F10.3	79,2	7,85
Branco	F11.0	57,2	1,27
	F11.1	62,8	1,40
	F11.2	66,6	1,60
	F11.3	71,8	1,91
	F11.4	81,2	1,84
	F11.5	86,2	1,62
	F11.6	87,4	1,45
	F11.7	88,4	1,24
	F11.8	89,8	1,15
	F11.9	91,2	1,58

A Figura 22 demonstra que as estirpes J273, J322-J327 apresentam curvas de amplificação típicas. Com base nos resultados obtidos na Figura 23 e na Tabela 13, verificou-se que a estirpe J323 é positiva para o gene *nheC*, apresentando um único pico na curva de *melting*, de 82°C (dentro do intervalo esperado $82^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). As restantes estirpes foram consideradas duvidosas por apresentarem dois picos na curva de *melting*. O produto de reacção do controlo positivo apresentou um único pico na curva de *melting*, de valor igual a 81,6°C. Os resultados obtidos nas restantes reacções foram muito semelhantes aos demonstrados anteriormente.

2.8. Pesquisa do gene *cytK*

Todas as estirpes testadas para o gene *cytK* revelaram-se negativas, não se tendo verificado nenhuma amplificação.

2.9. Pesquisa do gene *bceT*

O PCR em tempo real das estirpes J249, J321-J327, J250, J256, J258, J266 originou as curvas de amplificação demonstradas na Figura 24. As curvas de *melting* das estirpes que amplificaram o gene *bceT* estão representadas na Figura 25. A Tabela 14 indica os valores das temperaturas de *melting* das estirpes amplificadas.

Figura 24 – Curvas de amplificação das estirpes J248, J249, J321-J327, J250, J256, J258, J266 e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

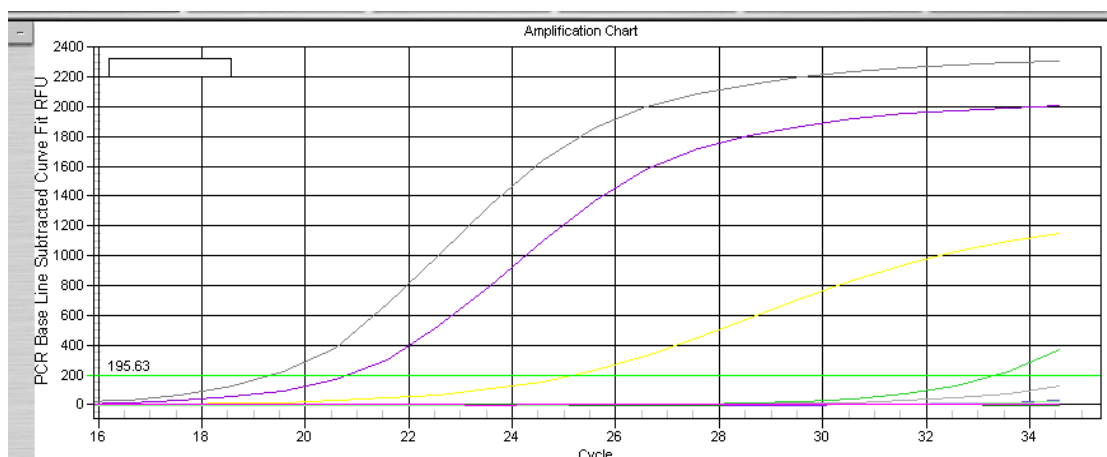


Figura 25 – Curvas de melting das estirpes J248, J249, J321-J327, J250, J256, J258, J266 e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

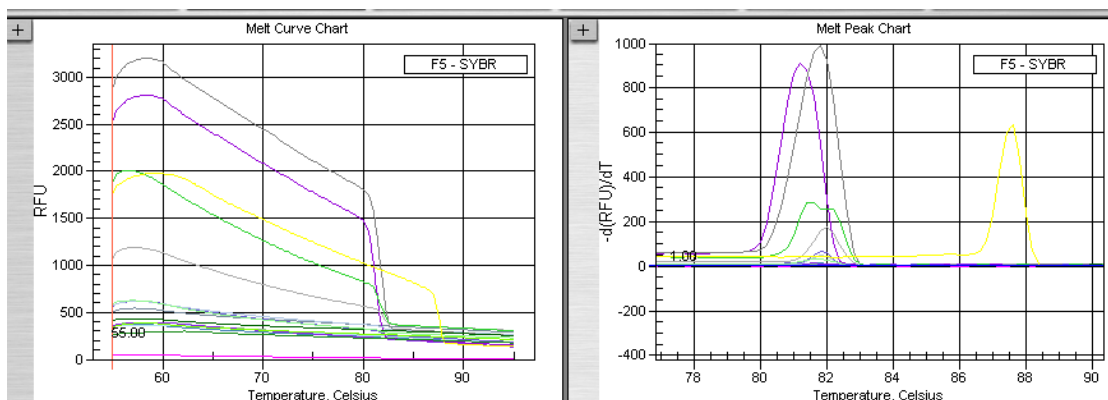
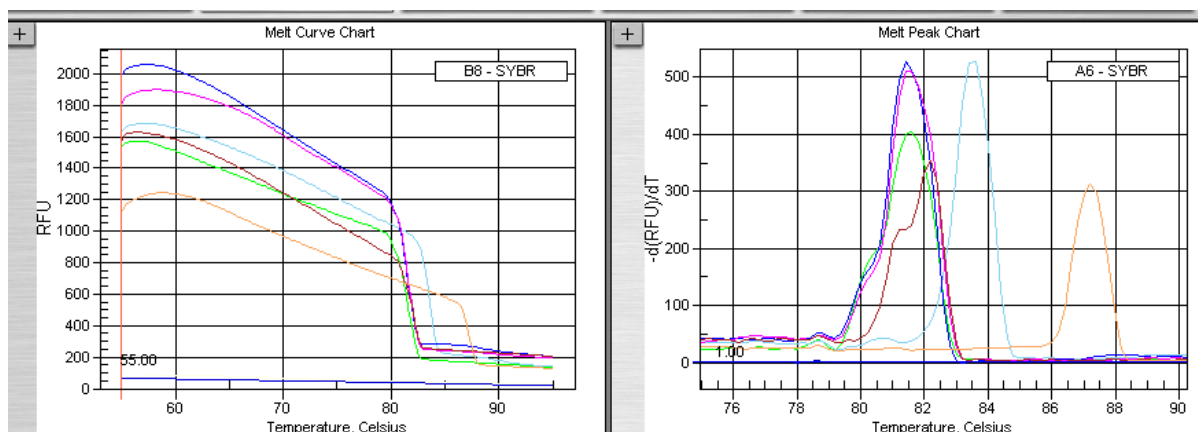


Tabela 14 – Temperaturas de *melting* das estirpes amplificadas e controlos positivo, de reacção, negativo e branco.

Estirpe	Pico	Temperatura de <i>melting</i> (°C)	Tamanho do pico (-d.RFU/dt)
J324	D02.0	81,2	908,15
J327	D05.0	81,8	988,81
C. Positivo	D06.0	82,0	175,45
C. Reacção	E11.0	87,6	633,09
C. Negativo	F03.0	59,8	15,54
	F03.1	60,6	13,34
Branco	F05.0	64,8	3,14
	F05.1	68,4	2,45
	F05.2	70,4	3,70
	F05.3	72,4	3,76
	F05.4	84,8	2,48
	F05.5	91,6	3,82

Através da análise de PCR em tempo real, verificou-se que as estirpes J324 e J327 apresentavam curvas de amplificação típicas. Com base nos resultados obtidos na Figura 25 e na Tabela 14, concluiu-se que as estirpes J324 e J327 são positivas para o gene *bceT*, apresentando um único pico na curva de *melting*. As temperaturas de *melting* destas estirpes, de 81,2°C e 81,8°C, respectivamente, encontram-se no intervalo 82°C±1°C. O produto de amplificação do controlo positivo, apesar de apresentar uma temperatura de *melting* de 82°C, não apresentou uma curva de amplificação típica, tendo começado o crescimento da curva apenas no ciclo 31.

Nas restantes reacções quase todas as estirpes com amplificação foram consideradas positivas, no entanto algumas apresentavam temperaturas de *melting* fora do intervalo considerado positivo (Figura 26, curva a azul claro).

Figura 26 – Curvas de *melting* das estirpes J4, J240, J241, J242, J243.

Os resultados obtidos em todas as reacções de PCR em tempo real encontram-se na Tabela 15. A maioria das estirpes apresentou resultados duvidosos na pesquisa dos genes em estudo, tanto pela presença de vários picos na curva de *melting*, como também devido a picos de *melting* com temperaturas consideradas fora do intervalo positivo. As estirpes positivas e duvidosas foram posteriormente analisadas por electroforese de ADN em gel.

Tabela 15 – Resultado do PCR em tempo real para as 75 estirpes analisadas.

Estirpe	Complexo HBL				Complexo NHE			Citotoxina K	Enterotoxina T
	<i>hblA</i>	<i>hblB</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>cytK</i>	<i>bceT</i>
J4	-	-	-	-	?	-	+	-	+
J238	+	-	-	?	?	?	+	-	-
J239	+	-	+	?	?	?	?	-	-
J240	+	-	?	?	?	?	?	-	+
J241	?	-	?	?	?	?	?	-	+
J242	?	-	?	?	?	?	?	-	+
J243	+	-	?	?	?	-	?	-	+
J244	-	-	-	-	-	-	?	-	-
J245	?	-	?	?	?	?	?	-	+
J246	?	-	?	?	?	-	+	-	+
J247	-	-	?	?	?	-	?	-	+
J248	-	-	-	-	?	?	-	-	-
J249	-	-	-	-	?	?	-	-	-
J250	+	-	?	?	?	-	+	-	-
J251	?	-	?	?	?	-	?	-	+
J252	?	-	?	?	?	-	?	-	+
J253	-	-	-	-	?	?	?	-	?
J254	?	-	?	?	?	?	?	-	?
J255	+	-	?	?	?	?	+	-	?
J256	+	-	?	?	?	?	+	-	?
J257	?	-	?	?	?	?	-	-	-
J258	?	-	?	?	?	?	-	-	-
J259	+	-	?	?	?	?	?	-	+
J260	?	-	?	?	?	?	?	-	+
J262	+	-	?	?	?	?	-	-	+
J263	-	-	-	-	?	-	+	-	+
J264	?	-	-	?	-	-	-	-	-
J266	-	-	-	-	?	?	?	-	-
J269	?	-	-	?	?	-	?	-	+
J270	+	-	-	?	?	-	?	-	-
J271	-	-	-	-	-	-	?	-	-

Tabela 15 (continuação)									
Estirpe	Complexo HBL				Complexo NHE			Citotoxina K	Enterotoxina T
	<i>hblA</i>	<i>hblB</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>cytK</i>	<i>bceT</i>
J272	-	-	-	-	-	-	?	-	+
J273	+	-	?	?	?	?	?	-	+
J274	-	-	-	-	-	-	?	-	+
J280	?	-	?	?	?	-	?	-	+
J281	-	-	-	-	?	-	?	-	+
J285	-	-	-	-	-	-	?	-	-
J286	-	-	-	-	-	-	+	-	-
J287	-	-	-	-	-	-	?	-	-
J288	-	-	-	-	-	?	?	-	+
J289	-	-	-	-	?	-	?	-	-
J290	-	-	-	-	?	?	?	-	-
J293	-	-	?	-	?	-	?	-	+
J294	-	-	?	-	-	?	?	-	+
J297	-	-	-	-	-	?	?	-	-
J298	-	-	-	-	-	-	?	-	+
J299	-	-	-	-	-	-	?	-	+
J300	-	-	-	-	-	-	?	-	-
J301	-	-	?	?	?	-	?	-	+
J302	-	-	-	-	?	?	?	-	-
J303	-	-	?	-	?	?	?	-	+
J304	-	-	-	-	?	?	-	-	+
J305	-	-	-	-	?	?	?	-	-
J306	?	-	?	?	?	-	?	-	+
J307	-	-	?	?	?	-	?	-	+
J308	-	-	?	-	-	?	-	-	-
J309	-	-	?	-	-	-	?	-	+
J310	-	-	-	-	?	?	-	-	?
J311	?	-	?	?	?	-	+	-	+
J312	-	-	-	-	-	-	?	-	+
J313	-	-	-	-	-	?	+	-	-
J314	-	-	-	-	-	?	?	-	-
J315	?	-	?	?	?	?	?	-	+
J316	-	-	-	-	-	?	+	-	-
J317	-	-	-	-	?	?	?	-	-
J318	-	-	-	-	-	?	?	-	+
J319	-	-	-	-	-	-	+	-	-
J320	+	-	?	?	?	?	?	-	+
J321	+	-	?	?	-	?	-	-	-
J322	-	-	-	-	?	?	?	-	-
J323	-	-	-	-	?	?	+	-	-

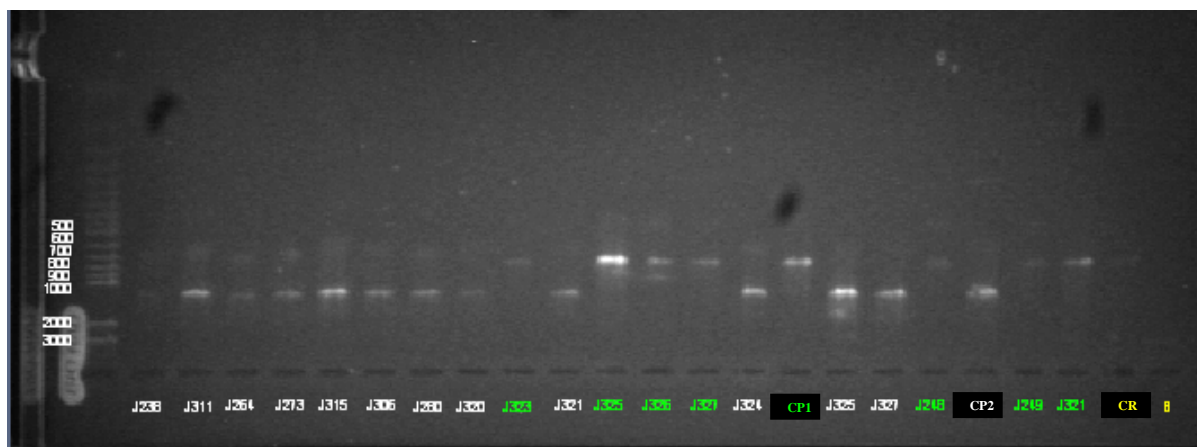
Tabela 15 (continuação)									
Estirpe	Complexo HBL				Complexo NHE			Citotoxina K	Enterotoxina T
	<i>hblA</i>	<i>hblB</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>cytK</i>	<i>bceT</i>
J324	+	-	?	?	?	?	?	-	+
J325	+	-	?	?	?	?	?	-	-
J326	-	-	-	-	?	?	?	-	-
J327	?	-	?	?	?	?	?	-	+

2.10. Electroforese de ADN em gel

Na análise dos resultados obtidos no PCR em tempo real verificou-se que o traçado das curvas de melting, para a maioria dos genes alvo, não era característico, apresentando dois ou mais picos de *melting*. Perante este facto decidiu-se investigar se estes resultados estariam relacionados com a amplificação de mais do que um fragmento de ADN procedendo-se à realização de electroforese de ADN em gel.

A electroforese em gel para a pesquisa do gene *hblA* demonstrou que, tanto as estirpes positivas, como as duvidosas, apresentavam apenas um único fragmento de ADN amplificado (Figura 27). Apenas a estirpe J325 apresentava dois fragmentos, um de aproximadamente 1000 pb e outro de quase 2000 pb. Nas restantes estirpes, o tamanho do fragmento de ADN amplificado era idêntico, ligeiramente superior a 1000 pb. Este resultado está de acordo com os 1154 pb esperados, que corresponde ao tamanho real do fragmento amplificado para o gene *hblA*. Isto sugere que, com excepção da estirpe J325, todas as estirpes previamente consideradas como duvidosas são potencialmente portadoras do gene *hblA*.

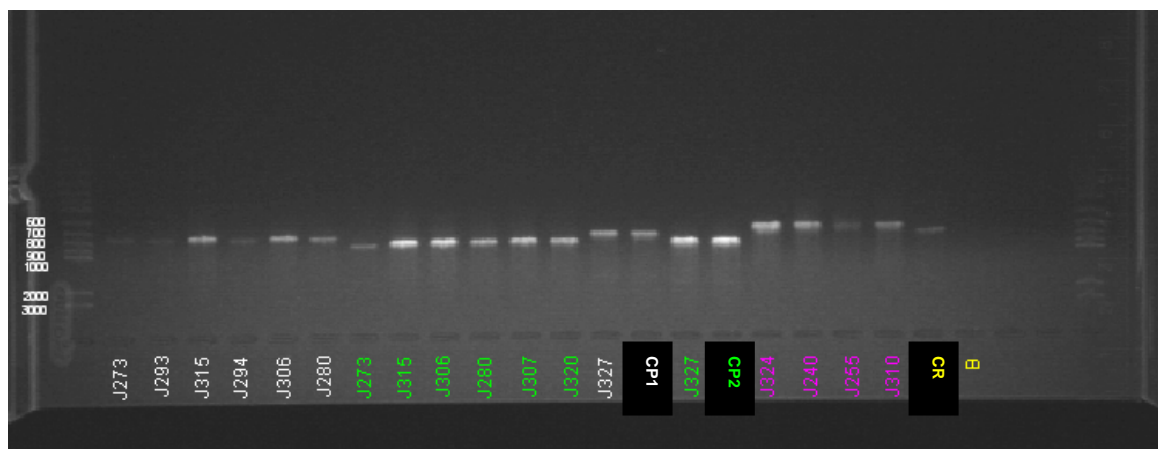
Figura 27 – Resultado da electroforese em gel para os genes *hblA* (amostras a branco) e *nheB* (amostras a verde).



A electroforese de ADN em gel para a pesquisa dos genes *hblC* e *hblD* demonstra que todas as estirpes analisadas amplificaram um único fragmento na reacção de PCR, de dimensões de cerca de 700 pb e 800 pb, respectivamente (Figura 28). O tamanho esperado do fragmento amplificado para o gene *hblC* era de 740 pb e para o gene *hblD* de 829 pb. Estes resultados confirmam assim que todas as estirpes, consideradas positivas ou duvidosas através da análise da curva de *melting*, são possivelmente positivas para os dois genes.

Na pesquisa do fragmento amplificado para o gene *bceT* (Figura 28, amostras a rosa) verificou-se a presença de um único fragmento de peso idêntico em todas as estirpes analisadas, entre 600 e 700 pb. O tamanho real do fragmento amplificado é de 661 pb, o que está de acordo com os resultados obtidos. Estes resultados indicam que todas as estirpes, consideradas, no ponto 2.9 deste trabalho, como duvidosas parecem ser, na verdade, positivas para o gene *bceT*.

Figura 28 – Resultado da electroforese em gel para os genes *hblC* (amostras a branco), *hblD* (amostras a verde) e *bceT* (amostras a rosa).



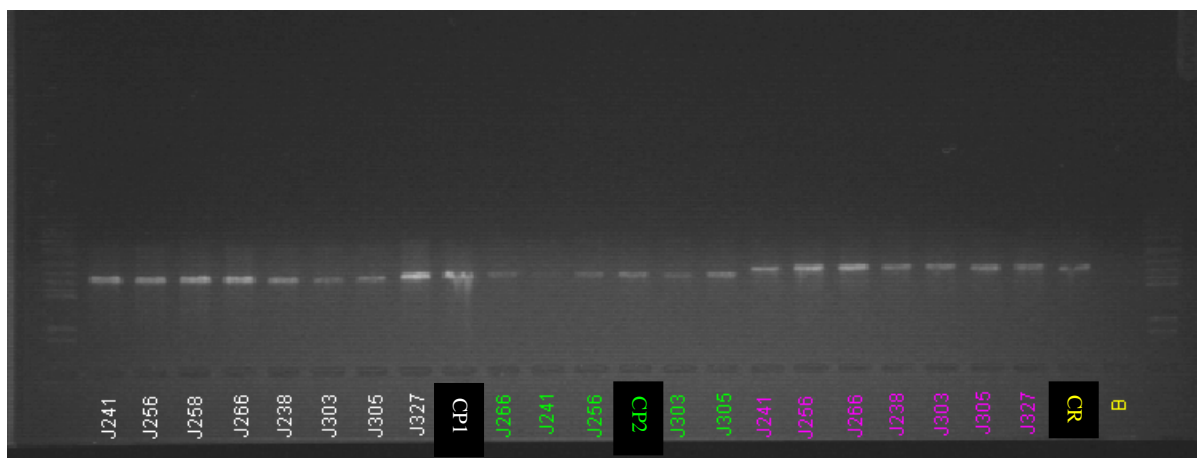
Na pesquisa do fragmento amplificado para o gene *nheA* (Figura 29, amostras a branco) verificou-se a presença de um único fragmento de dimensão idêntica em todas as estirpes analisadas, entre 700 e 800 pb, sendo o tamanho real do fragmento amplificado de 755 pb. Estes resultados indicam que todas as estirpes, consideradas, no ponto 2.5 deste trabalho, como duvidosas são possivelmente positivas para o gene *nheA*.

A electroforese em gel para a pesquisa do gene *nheB* demonstrou que, tanto as estirpes positivas, como as duvidosas, apresentavam apenas um único fragmento de ADN amplificado (Figura 27 e 29). Apenas a estirpe J326 apresentava dois fragmentos, um de 700-800 pb e outro de 800-900 pb (Figura 28). Nas restantes estirpes, o tamanho do fragmento de ADN amplificado era idêntico, entre 700-800 pb. Este resultado está de acordo com os 734 pb esperados, que corresponde ao tamanho real do fragmento amplificado para o gene *nheB*. Assim, com excepção da estirpe J326, possivelmente todas as estirpes previamente consideradas como duvidosas são positivas para o gene *nheB*.

Na pesquisa do fragmento amplificado para o gene *nheC* (Figura 29, amostras a rosa) verificou-se a presença de um único fragmento de dimensão idêntica em todas as estirpes analisadas, entre 600-700 pb, sendo o tamanho real do fragmento amplificado de 683 pb.

Pelos resultados obtidos as estirpes, consideradas como duvidosas, no ponto 2.7 deste trabalho, podem ser consideradas positivas exprimindo o gene *nheC*.

Figura 29 – Resultado da electroforese em gel para os genes *nheA* (amostras a branco), *nheB* (amostras a verde) e *nheC* (amostras a rosa).



2.11. Alinhamento das sequências nucleotídicas

Após a realização das electroforeses verificou-se que a maioria das estirpes amplificavam apenas um único fragmento com as dimensões esperadas. Desta forma, foi possível descartar a hipótese da existência amplificações de vários fragmentos no PCR em tempo real, que originassem o traçado invulgar das curvas de melting. Por outro lado, não ficou explicada a divergência encontrada nas temperaturas de *melting* das estirpes potencialmente positivas.

Perante os resultados obtidos decidiu-se efectuar o alinhamento das sequências de nucleótidos correspondentes aos genes que codificam as enterotoxinas, em várias estirpes para verificar se os genes que codificavam as enterotoxinas de *B. cereus sensu stricto* apresentavam variabilidade entre si, ou se eram genes altamente conservados. O resultado do alinhamento destas sequências (Anexo 2) indicou que os genes que codificam as enterotoxinas apresentam regiões não conservadas, verificando-se, em muitas destas regiões, diferenças em bases guanina e citosina (expressando-se no seu lugar os nucleótidos timina ou adenina). No Anexo 2 encontra-se a representação das sequências alinhadas. As regiões conservadas encontram-se marcadas com um asterisco, as regiões que apresentam variabilidade não se encontram marcadas.

Para além do alinhamento foi também calculada a temperatura de melting para cada uma das estirpes utilizadas no alinhamento. Os resultados apresentados na Tabela 16 demonstraram que, para um mesmo gene existem estirpes com conteúdos GC diferentes e temperaturas de melting também diferentes

Tabela 16 – Estudo da variabilidade dos genes que codificam as enterotoxinas.

Estirpe	Gene	% GC	Temperatura de <i>melting</i>
<i>B. cereus</i> ATCC 14579 <i>B. cereus</i> NR0149 <i>B. cereus</i> F0025 <i>B. cereus</i> TG0014 <i>B. cereus</i> <i>B. cereus</i> I20	<i>hblA</i>	33 35 34 35 32 32	82 82 82 82 81 81
<i>B. cereus</i> ATCC 14579 <i>B. cereus</i> NR0149 <i>B. cereus</i> F0025 <i>B. cereus</i> TG0014 <i>B. cereus</i> L2	<i>hblC</i>	29 33 32 32 32	81 82 81 81 82
<i>B. cereus</i> ATCC 14579 <i>B. cereus</i> NR0149 <i>B. cereus</i> F0025 <i>B. cereus</i> TG0014 <i>B. cereus</i> F4635A/90 <i>B. cereus</i> CIP 103472	<i>hblD</i>	37 37 37 36 36 36	83 83 83 82 82 82
<i>B. cereus</i> NVH 391/98 <i>B. cereus</i> NVH 883/00 <i>B. cereus</i> A6 <i>B. cereus</i> NVH 0075-95 <i>B. cereus</i> C33	<i>nheA</i>	34 34 32 32 33	82 82 81 81 82
<i>B. cereus</i> NVH 391/98 <i>B. cereus</i> NVH 883/00 <i>B. cereus</i> A6 <i>B. cereus</i> NVH 0075-95	<i>nheB</i>	35 35 36 36	82 82 83 83
<i>B. cereus</i> NVH 391/98 <i>B. cereus</i> NVH 883/00 <i>B. cereus</i> A6 <i>B. cereus</i> NVH 0075-95	<i>nheC</i>	35 34 33 34	82 82 81 82

2.12. Resultados da pesquisa dos genes que codificam as enterotoxinas de *B. cereus*

Após a realização do PCR em tempo real, da electroforese de ADN em gel e do alinhamento das sequências nucleotídicas dos vários genes que codificam as enterotoxinas verificou-se que a maioria das estirpes consideradas duvidosas eram, na realidade, positivas para os genes em estudo (Tabela 17).

Tabela 17 – Resultados da pesquisa de enterotoxinas de *B. cereus* em 75 estirpes de origem alimentar.

Estirpe	Complexo HBL				Complexo NHE			Citotoxina K	Enterotoxina T
	<i>hblA</i>	<i>hblB</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>cytK</i>	<i>bceT</i>
J4	-	-	-	-	+	-	+	-	+
J238	+	-	-	+	+	+	+	-	-
J239	+	-	+	+	+	+	+	-	-
J240	+	-	+	+	+	+	+	-	+
J241	+	-	+	+	+	+	+	-	+
J242	+	-	+	+	+	+	+	-	+
J243	+	-	+	+	+	-	+	-	+
J244	-	-	-	-	-	-	+	-	-
J245	+	-	+	+	+	+	+	-	+
J246	+	-	+	+	+	-	+	-	+
J247	-	-	+	+	+	-	+	-	+
J248	-	-	-	-	+	+	-	-	-
J249	-	-	-	-	+	+	-	-	-
J250	+	-	+	+	+	-	+	-	-
J251	+	-	+	+	+	-	+	-	+
J252	+	-	+	+	+	-	+	-	+
J253	-	-	-	-	+	+	+	-	+
J254	+	-	+	+	+	+	+	-	+
J255	+	-	+	+	+	+	+	-	+
J256	+	-	+	+	+	+	+	-	+
J257	+	-	+	+	+	+	-	-	-
J258	+	-	+	+	+	+	-	-	-
J259	+	-	+	+	+	+	+	-	+
J260	+	-	+	+	+	+	+	-	+
J262	+	-	+	+	+	+	-	-	+
J263	-	-	-	-	+	-	+	-	+
J264	+	-	-	+	-	-	-	-	-
J266	-	-	-	-	+	+	+	-	-
J269	+	-	-	+	+	-	+	-	+
J270	+	-	-	+	+	-	+	-	-
J271	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Tabela 17 (continuação)

Estirpe	Complexo HBL				Complexo NHE			Citotoxina K	Enterotoxina T
	<i>hblA</i>	<i>hblB</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>cytK</i>	<i>bceT</i>
J272	-	-	-	-	-	-	+	-	+
J273	+	-	+	+	+	+	+	-	+
J274	-	-	-	-	-	-	+	-	+
J280	+	-	+	+	+	-	+	-	+
J281	-	-	-	-	+	-	+	-	+
J285	-	-	-	-	-	-	+	-	-
J286	-	-	-	-	-	-	+	-	-
J287	-	-	-	-	-	-	+	-	-
J288	-	-	-	-	-	+	+	-	+
J289	-	-	-	-	+	-	+	-	-
J290	-	-	-	-	+	+	+	-	-
J293	-	-	+	-	+	-	+	-	+
J294	-	-	+	-	-	+	+	-	+
J297	-	-	-	-	-	+	+	-	-
J298	-	-	-	-	-	-	+	-	+
J299	-	-	-	-	-	-	+	-	+
J300	-	-	-	-	-	-	+	-	-
J301	-	-	+	+	+	-	+	-	+
J302	-	-	-	-	+	+	+	-	-
J303	-	-	+	-	+	+	+	-	+
J304	-	-	-	-	+	+	-	-	+
J305	-	-	-	-	+	+	+	-	-
J306	+	-	+	+	+	-	+	-	+
J307	-	-	+	+	+	-	+	-	+
J308	-	-	+	-	-	+	-	-	-
J309	-	-	+	-	-	-	+	-	+
J310	-	-	-	-	+	+	-	-	+
J311	+	-	+	+	+	-	+	-	+
J312	-	-	-	-	-	-	+	-	+
J313	-	-	-	-	-	+	+	-	-
J314	-	-	-	-	-	+	+	-	-
J315	+	-	+	+	+	+	+	-	+
J316	-	-	-	-	-	+	+	-	-
J317	-	-	-	-	+	+	+	-	-
J318	-	-	-	-	-	+	+	-	+
J319	-	-	-	-	-	-	+	-	-
J320	+	-	+	+	+	+	+	-	+
J321	+	-	+	+	-	+	-	-	-
J322	-	-	-	-	+	+	+	-	-
J323	-	-	-	-	+	+	+	-	-

Tabela 17 (Continuação)

Estirpe	Complexo HBL				Complexo NHE			Citotoxina K	Enterotoxina T
	<i>hblA</i>	<i>hblB</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>cytK</i>	<i>bceT</i>
J324	+	-	+	+	+	+	+	-	+
J325	?	-	+	+	+	+	+	-	-
J326	-	-	-	-	+	?	+	-	-
J327	+	-	+	+	+	+	+	-	+

Neste estudo obtiveram-se 28 estirpes que potencialmente expressam o complexo HBL (Tabela 18), outras 27 estirpes são potenciais produtoras do complexo NHE (Tabela 19) e 43 estirpes carregam o gene para a enterotoxina T (Tabela 20). A pesquisa do gene da citotoxina K revelou-se negativa para a totalidade das estirpes analisadas.

Tabela 18 – Resultados da pesquisa da enterotoxina HBL.

Presença do gene	Positivo	Negativo	Total	Frequência Relativa (dos positivos)
<i>hblA</i>	31	44	75	41,3%
<i>hblB</i>	0	75	75	0%
<i>hblC</i>	36	39	75	48,0%
<i>hblD</i>	35	40	75	46,7%
Complexo <i>hblA+hblC+hblD</i>	27	48	75	36,0%

Tabela 19 – Resultado da pesquisa da enterotoxina não-hemolítica.

Presença do gene	Positivo	Negativo	Total	Frequência Relativa (dos positivos)
<i>nheA</i>	52	23	75	69,3%
<i>nheB</i>	42	33	75	56,0%
<i>nheC</i>	65	10	75	86,7%
Complexo <i>nheA+nheB+nheC</i>	26	49	75	34,7%

Tabela 20 – Resultado da pesquisa da enterotoxina T.

Presença do gene	Positivo	Negativo	Total	Frequência Relativa (dos positivos)
<i>bceT</i>	43	33	75	57,3%

Das 75 estirpes analisadas apenas 17 se revelaram negativas para a potencial produção de todas as enterotoxinas pesquisadas. A Tabela 21 revela o número de estirpes potencialmente produtoras de uma ou várias toxinas. Verificou-se que a maioria das estirpes codificou apenas a enterotoxina T (32,8%), no entanto existe também uma percentagem considerável de estirpes que codificaram mais do que uma toxina, sendo que 25,9% codificaram a enterotoxina hemolítica BL e a enterotoxina não hemolítica e 24,1% das estirpes codificaram a HBL, NHE e BceT.

Tabela 21 – Número de estirpes portadoras dos genes que codificam enterotoxinas.

Genes	Positivo	Total	Frequência Relativa (dos positivos)
só HBL	4	58	6,9%
só NHE	8	58	13,8%
só BceT	19	58	32,8%
só HBL+BceT	8	58	13,8%
só NHE+BceT	3	58	5,2%
HBL+NHE	15	58	25,9%
HBL+NHE+BceT	14	58	24,1%

Depois de se estudar a frequência das estirpes potencialmente enterotóxicas, cruzaram-se os dados obtidos com a origem das estirpes. As refeições de carne e de peixe englobam pratos confeccionados com o respectivo acompanhamento (Anexo 1), as saladas incluem saladas de alface e/ou tomate e salada de atum, os lacticínios são constituídos por gelados de vários sabores, os produtos de salsicharia, tal como o nome indica, incluem fiambre, bacon, chouriço. O item designado como outros inclui alimentos como farinhas e carnes cruas.

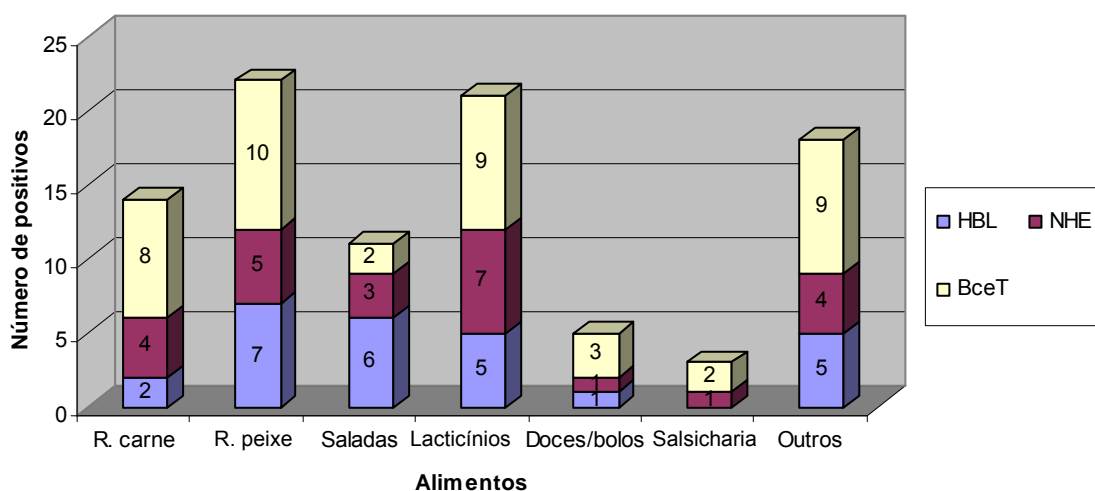
Verificou-se uma elevada percentagem de estirpes potencialmente enterotóxicas em todos os grupos de alimentos, com destaque para as refeições de pescado e doces/bolos (ambos com 100% de resultados positivos), as refeições de carne (90% de positivos) e as saladas (com 80% de resultados positivos).

Tabela 22 – Distribuição das estirpes potencialmente patogénicas por tipo de alimento.

Alimentos	Positivos	Negativos	Total	Frequência relativa dos positivos
Refeições de carne	9	1	10	90,0%
Refeições de peixe	12	0	12	100%
Saladas	8	2	10	80,0%
Lacticínios	12	11	23	52,2%
Doces/bolos	3	0	3	100%
Produtos de salsicharia	2	1	3	66,7%
Outros	11	3	14	78,6%

A Figura 30 ilustra a distribuição das estirpes que codificam as enterotoxinas de *B. cereus* pelos vários alimentos analisados. Verificou-se que, com excepção das saladas, em todos os alimentos analisados a maioria das estirpes isoladas codificava a enterotoxina T. Nas saladas a toxina codificada em maior número era a enterotoxina hemolítica BL. A enterotoxina NHE aparece em segundo lugar nas estirpes isoladas de refeições de carne, dos lacticínios e dos produtos de salsicharia. Nas refeições de peixe, nas saladas e no grupo definido como outros alimentos é a enterotoxina hemolítica BL a codificada por maior número de estirpes, após a enterotoxina T.

Figura 30 – Gráfico que ilustra a distribuição das várias enterotoxinas pelos alimentos analisados.



V. Discussão

Neste trabalho foi efectuado, em primeiro lugar, uma caracterização fenotípica das bactérias utilizadas para pesquisa das enterotoxinas. Todas as estirpes em estudo, quando isoladas em meio MYP, formavam colónias cor-de-rosa rodeadas por um halo. Como *B. cereus* não possui a capacidade de fermentar o manitol, não ocorre a formação de ácido e consequentemente as colónias adquirem uma tonalidade rosa, devido à presença do indicador vermelho fenol. O halo em redor das colónias deve-se à degradação da lecitina da gema do ovo pela lecitinase. Do isolamento das bactérias em MYP podem-se retirar dois factos importantes: que as estirpes em estudo não fermentam o manitol e que são produtoras de lecitinase. Estas características são evidenciadas pelos microrganismos do grupo *B. cereus* (Arnesen *et al.*, 2008).

Pelo crescimento em agar constatou-se que três das 76 estirpes apresentavam crescimento rizóide. Este tipo de morfologia é característico de *B. mycoides* e *B. pseudomycoides* (Nakamura, 1998). Contudo, os resultados obtidos no API 50 CH[®] não estão de acordo com as características morfológicas das colónias em agar. De facto, a estirpe J240 apresenta crescimento rizóide em agar e bioquimicamente foi classificada com *B. mycoides*. No entanto, as estirpes J264 e J310 apesar de apresentarem crescimento rizóide em agar, foram classificadas bioquimicamente como *B. cereus*. Tal facto pode-se verificar, uma vez que *B. mycoides* e *B. cereus* são bioquimicamente idênticos. A diferenciação entre estes dois microrganismos pode ser realizada com base na análise do conteúdo em ácidos gordos (Nakamuro, 1998).

A análise bioquímica das estirpes utilizadas neste estudo revela que 40 dos 76 isolados pertencem a *B. cereus sensu stricto*, 34 a *B. mycoides* e apenas uma estirpe a *B. anthracis*. Esta última estirpe, no entanto, apresentava hemólise em agar sangue. Idealmente, deveria ser realizada a pesquisa do gene *cap* e *pagA*, que codificam, respectivamente, a produção da cápsula e das toxinas de *B. anthracis* (Arnesen *et al.*, 2008).

Segundo Logan & Berkeley (1984) todas as estirpes de grupo *B. cereus* metabolizam a glucose e, a sua maioria, metaboliza a ribose, a D-frutose, a N-acetilglucosamina, a esculina, a maltose, a trealose, o amido e o glicogénio. Molva *et al.* (2009) verificou que todas as estirpes utilizadas no seu estudo metabolizavam a glucose, ribose e a maltose. Neste trabalho todas as estirpes metabolizavam a glucose, apenas uma não metabolizava a frutose (J249) e todas as estirpes metabolizavam a maltose, trealose e esculina (dados não fornecidos). Das 76 estirpes analisadas, 25 não hidrolisavam o amido nem o glicogénio. Esta característica é típica das estirpes eméticas de *B. cereus*, que não metabolizam o amido, glicogénio nem a salicina (Carlin *et al.*, 2006). No entanto, destas 25 estirpes, 8

metabolizavam a salicina (J248, J249, J274, J288, J298, J299, J314 e J326). Pode-se dizer então que existem 17 estirpes potencialmente produtoras de cereulida, uma vez que não metabolizam o amido, glicogénio nem a salicina. A confirmação seria possível através da pesquisa do gene *ces* por PCR (Arnesen *et al.*, 2008).

Outra característica fenotípica que ajuda na distinção dos microrganismos deste grupo é a produção de hemólise em agar sangue. *B. cereus sensu stricto* é fortemente hemolítico, enquanto que *B. anthracis*, geralmente, não é hemolítico. *B. mycoides* tanto pode apresentar hemólise em agar sangue, como pode ser fracamente hemolítico (Lindbäck & Granum, 2000). Neste estudo as 68 estirpes que apresentavam β -hemólise pertenciam a *B. cereus* ou a *B. mycoides*, o que está de acordo com o referenciado por Lindbäck & Granum (2000). As estirpes J281, J293, J294, J301 e J307 eram fracamente hemolíticas e três estirpes não formavam hemólise em agar sangue. A estirpe J264, que possuía crescimento rizóide em agar, não demonstrava hemólise. No entanto, as estirpes J240 e J310, também com crescimento rizóide, eram hemolíticas. Isto está de acordo com Lindbäck & Granum (2000) que demonstraram que *B. mycoides* tanto pode ser hemolítico como não. A presença de estirpes não hemolíticas e fracamente hemolíticas pode estar associadas tanto a *B. mycoides* como a *B. anthracis*. Considerando que uma das estirpes não hemolíticas apresentava crescimento rizóide, seria interessante pesquisar se as restantes pertenceriam a *B. anthracis* ou se seriam incluídas noutra espécie de *B. cereus sensu lato*.

Em relação à pesquisa dos genes que codificam as enterotoxinas de *B. cereus* verificou-se que, dos 76 isolados, 58 codificavam, pelo menos, uma enterotoxina.

A pesquisa dos genes *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB* e *nheC*, em PCR em tempo real, demonstrou que as estirpes com curvas de amplificação típicas possuíam curvas de *melting* bastante heterogéneas. A maioria das estirpes apresentava dois (ou mais) picos na curva de *melting* e as que apresentavam um só pico, possuíam diferentes temperaturas de *melting* para o mesmo gene alvo. A presença de vários picos poderia significar que se estavam a amplificar fragmentos diferentes com o mesmo *primer*. A amplificação de vários fragmentos poderia ocorrer em caso de contaminação da amostra ou devido à utilização de amplicões não específicos (Maurer, 2006). Perante isto, determinou-se por electroforese de ADN em gel o número de fragmentos amplificados. Curiosamente, para a maioria das estirpes, obteve-se apenas um único fragmento amplificado com a dimensão do gene em estudo. Apenas a estirpe J325, na pesquisa do gene *hblA*, e a estirpe J326, na pesquisa do gene *nheB*, apresentavam dois fragmentos. No primeiro caso, um dos fragmentos possuía cerca de 1000 pb, que corresponde ao tamanho do gene *hblA* (1154 pb), e o segundo fragmento possuía 2000 pb. Este segundo fragmento poderia resultar da amplificação de um fragmento inespecífico.

Em relação à variação na temperatura de *melting*, a pesquisa do gene *hblA* deveria originar curvas com um pico nos $82^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. No entanto, as temperaturas variaram entre $80,4^{\circ}\text{C}$ e $83,6^{\circ}\text{C}$. Uma situação semelhante verificou-se também nos resultados obtidos para os genes *hblC*, *hblD*, *nheB*, *nheC* e, em menor escala, para o gene *nheA*. As variações encontradas nas temperaturas de *melting* podem ser explicadas pela grande variabilidade existente nos genes que codificam as enterotoxinas (Prüß, Dietrich, Nibler, Martlbauer & Scherer, 1999; Hansen & Hendriksen, 2001; Ehling-Schulz *et al.*, 2006). Ehling-Schulz *et al.* (2006) demonstraram, através de um estudo de caracterização genética de estirpes eméticas e enterotóxicas de *B. cereus*, que os genes que codificam as enterotoxinas apresentam grande diversidade a nível molecular, ao contrário do gene da cereulida que é altamente conservado. De modo a confirmar os resultados obtidos, foi realizado o alinhamento de várias sequências nucleotídicas que expressam estes genes. Verificou-se que os genes que codificam as enterotoxinas apresentam algumas regiões não conservadas. Nestas regiões, e para a mesma localização nucleotídica, existem estirpes que, por exemplo, exibem o nucleótido guanina, enquanto que outras exibem adenina. Desta forma, as sequências que codificam um mesmo gene, em diferentes estirpes, são formadas por diferentes conteúdos GC. Considerando que o conteúdo GC de uma sequência nucleotídica dita a temperatura de *melting* dessa sequência (Prescott *et al.*, 2008), diferentes conteúdos GC originam temperaturas de *melting* diferentes. Com base nestes resultados calculou-se a temperatura de *melting* das estirpes utilizadas no alinhamento e verificaram-se variações de cerca de 1°C . Esta variação permite justificar os resultados obtidos no PCR em tempo real.

Com base nos resultados obtidos no PCR em tempo real, no alinhamento das sequências e no cálculo da temperatura de *melting*, pode-se afirmar com algum grau de confiança que as estirpes consideradas duvidosas no PCR são efectivamente positivas para os genes pesquisados. No entanto, a certeza dos resultados só seria conseguida realizando a sequenciação dos fragmentos amplificados.

Guinebretière *et al.* (2002) realizaram um estudo sobre a incidência de enterotoxinas em 51 estirpes de *B. cereus*, de origem alimentar. Os *primers* utilizados neste trabalho foram retirados deste estudo. Guinebretière demonstrou que 93% dos isolados possuíam os genes que codificam a enterotoxina HBL, aproximadamente 100% codificavam a NHE, 57% a enterotoxina T e 71% dos isolados codificavam a citotoxina K. Ngamwangsatit, Buasri, Pianariyanon, Pulsrikarn & Ohta (2008) verificou que 65.94% das estirpes eram portadoras do operão *hblCDA*. No presente trabalho, apenas 36.8% das estirpes possuíam os três genes que codificam a enterotoxina hemolítica BL. A discrepância na frequência de positivos entre os resultados obtidos neste trabalho em relação a estudos já publicados, pode estar relacionada com a origem das amostras. Os estudos referenciados anteriormente indicam

que a pesquisa de enterotoxinas incidiu sobre isolados alimentares, mas não em quais alimentos. Assim, diferentes alimentos podem ser contaminados por diferentes estirpes de *B. cereus*. Também o microbismo próprio de cada país pode originar diferentes resultados. Os estudos citados neste trabalho foram realizados em países como a França, Dinamarca, Noruega, etc., países com características bastante diferentes de Portugal (clima, hábitos alimentares, etc.). A flora bacteriana diversifica-se de país para país e o facto de existir, em alguns países, uma elevada percentagem de *B. cereus* enterotóxicos, não significa que em Portugal essa situação também tenha de ocorrer. A discrepância dos resultados obtidos face aos estudos já publicados pode também ser o reflexo de diferenças ecológicas entre os microrganismos (Guinebretière *et al.*, 2008). Seria, por isso, interessante, comparar os resultados obtidos neste trabalho com um estudo semelhante realizado em Portugal.

Também a pesquisa do operão *nheABC* revelou uma grande discrepância nos resultados em relação a outros estudos. Ouoba *et al.* (2008) e Guinebretière *et al.* (2002) obtiveram cerca de 100% de estirpes positivas para os genes que codificam a enterotoxina não-hemolítica. Neste estudo, apenas 35.5% das estirpes expressavam os genes *nheA*, *nheB* e *nheC* simultaneamente. No entanto, também Hansen & Hendriksen (2001) obteve apenas 59% de estirpes positivas para esta toxina.

A pesquisa do gene que codifica a citotoxina K revelou, curiosamente, que todas as estirpes utilizadas neste trabalho eram negativas para esta toxina. Os *primers* utilizados para a pesquisa da CytK foram construídos a partir da estirpe *B. cereus* 391-98. Este mesmo *primer* foi utilizado num estudo de Lund *et al.* (2000), que revelou também que as 19 estirpes de *B. cereus* pesquisadas eram negativas para o gene *cytK*. Fagerlund *et al.* (2004), ao pesquisar a presença do gene *cytK* utilizou um *primer* diferente, obtendo 13 estirpes positivas. A citotoxina K apresenta duas variantes: a citotoxina K₁ e a citotoxina K₂. O *primer* utilizado neste trabalho codificava a citotoxina K₁, enquanto que o *primer* utilizado por Fagerlund codificava a citotoxina K₂. A homologia entre estas duas variantes é de apenas 89%. Assim, não se pode afirmar que nenhuma das estirpes utilizadas neste trabalho não expressa a citotoxina K, apenas se pode dizer que não expressa a variante CytK₁. Seria interessante pesquisar a presença da citotoxina K₂ nestas estirpes.

Radhika, Padmapriya, Chandrashekar, Keshava & Voradaraj (2002) demonstraram que 50% das estirpes analisadas possuíam o gene *bceT*. Guinebretière *et al.* (2002) obteve 71% de estirpes positivas para a pesquisa deste gene enquanto que Hansen *et al.* (2001) num estudo semelhante obtiveram 50% de estirpes positivas. Neste trabalho e, à semelhança dos estudos referidos anteriormente, 56.6% das estirpes revelaram ser positivas para o gene *bceT*.

Apesar da maioria das estirpes serem positivas para o gene *bceT*, a grande preocupação incide sobre as estirpes positivas para a toxina HBL, NHE e CytK, uma vez que, até à data,

ainda não foi associado nenhum caso de toxinfecção alimentar à enterotoxina T. Um estudo interessante seria verificar se a produção da enterotoxina T juntamente com a HBL e/ou NHE tem alguma implicação na acção destas duas toxinas.

Das 58 estirpes que possuem os genes que codificam as enterotoxinas, verificou-se que 16 poderiam ser muito enterotóxicas, uma vez que possuem todos os genes que codificam a enterotoxina HBL e NHE. Quatro estirpes expressavam apenas a HBL e oito apenas a NHE. A presença dos três genes que codificam as enterotoxinas tri-partidas HBL e NHE é requisito necessário para que ocorra a produção da toxina. No entanto, por si só, não é indicador da sua produção. A produção destas duas toxinas está dependente do regulador de transcrição PlcR, que no genoma se localiza antes do gene *hblC* ou do gene *nheA*. A ausência do PlcR impede a produção das toxinas HBL e NHE (Gohar *et al.*, 2002). Seria então interessante pesquisar se as estirpes portadoras do operão *nhe* e *hbl* também expressam o gene que codifica o factor de transcrição PlcR, bem como pesquisar a presença do ARNm interveniente na produção das enterotoxinas.

Quando se cruzam os dados obtidos anteriormente com a origem de cada uma das estirpes, verificou-se que todas as refeições de peixe, bem como todos os bolos/doces analisados possuíam estirpes de *B. cereus* potencialmente patogénicas. Pielaat, Fricker, Nauta & Leusden (2005) realizaram um estudo de prevalência de estirpes diarreicas e eméticas de *B. cereus* isoladas a partir de alimentos (85 estirpes). Estes autores verificaram que apenas 2% das estirpes isoladas a partir de bolos contribuíam para a síndrome diarreica, mas não especificavam qual a toxina envolvida. Neste trabalho, as três estirpes isoladas a partir de bolos codificavam a enterotoxina T e uma estirpe também codificava a enterotoxina hemolítica BL. No entanto, devido à amostra ser diminuta não é possível retirar mais conclusões sobre estes resultados.

No estudo realizado por Pielaat *et al.* (2005) o grupo de alimentos que evidenciava maior percentagem de estirpes enterotóxicas correspondia a pratos de arroz e de carne. Neste trabalho, todos os pratos que apresentavam arroz como acompanhamento possuíam estirpes que codificavam pelo menos uma enterotoxina (as estirpes J4 e J304 codificava a enterotoxina T, a estirpe J306 as toxinas HBL e a enterotoxina T, a estirpe J325 a NHE e a estirpe J324 codificava as toxinas HBL e NHE). O arroz é um alimento muito associado a toxinfecções alimentares por *B. cereus*, uma vez que o meio de cultura deste alimento é constituído por cerca de 10% deste microrganismo (Cronin *et al.*, 2009). O arroz já descascado pode conter $2,5 \times 10^3$ UFC/g de *B. cereus* (Cronin *et al.*, 2009). Este alimento, antes de cozinhar, contém endosporos que germinam se este alimento for armazenado à temperatura ambiente após a cozedura. O re-aquecimento rápido não reduz muito o número de bactérias presentes no alimento, mantendo a dose infecciosa necessária para causar síndrome diarreica.

Nas refeições de carne, 80% dos isolados obtidos correspondiam a estirpes que codificavam enterotoxinas de *B. cereus*. A maioria dos isolados codificava a enterotoxina T e a enterotoxina não hemolítica. Estes resultados estão de acordo com Borge *et al.* (2001) que indicam que a maioria das estirpes isoladas a partir de refeições de carne codificam a enterotoxina T e, em menor percentagem, a enterotoxina NHE. No estudo realizado por estes autores não se obteve nenhuma estirpe positiva para a toxina HBL.

A contaminação de produtos frescos com microrganismos do grupo *B. cereus* é quase inevitável e a capacidade destas bactérias produzirem esporos permitem a sua sobrevivência em condições adversas (Molva *et al.*, 2009). Assim não é de estranhar a presença deste microrganismo no leite. *B. cereus* é um contaminante comum do leite e seus derivados (Borge *et al.*, 2001; Svensson *et al.*, 2007; Molva *et al.*, 2009). A maior contaminação do leite por *B. cereus* ocorre nas explorações (Svensson *et al.*, 2007). Como este microrganismo produz endosporos resistentes a tratamentos térmicos como a pasteurização, é possível encontrá-lo no leite pasteurizado HTST e UHT. Neste estudo verificou-se que 52,2% das estirpes isoladas a partir de laticínios eram potencialmente, codificando principalmente a enterotoxina T (9 estirpes), seguida da NHE (7 estirpes) e da HBL (5 estirpes). Borge *et al.* (2001) pesquisaram por PCR a presença dos genes que codificam as enterotoxinas em leites e produtos derivados. Estes autores verificaram que todas as estirpes (8) codificam a toxina NHE e BceT e que apenas duas estirpes não codificavam a enterotoxina HBL.

Outro produto fresco habitualmente contaminado por *B. cereus* é a salada. Este microrganismo é um habitante natural do solo, razão pela qual as saladas e os restantes vegetais aparecem frequentemente contaminados. Neste trabalho 80% dos microrganismos isolados a partir de saladas codificavam pelo menos uma enterotoxina, sendo na maior parte dos casos a toxina hemolítica BL.

Este trabalho constitui uma primeira abordagem no estudo da relação entre a presença de uma determinada enterotoxina e um grupo de alimentos específico. Deverá ser realizado um estudo posterior, com uma amostra mais significativa e, idealmente, existir outros estudos semelhantes, nomeadamente em Portugal, de modo a realizar uma comparação de resultados que permitam estabelecer alguma relação entre a produção de uma determinada toxina com a origem da estirpe.

VI. Conclusões

B. cereus sensu lato é formado por um conjunto de microrganismos bastante próximos, tanto a nível do fenótipo como a nível molecular. Este trabalho deparou-se com a dificuldade de caracterizar a colecção de bactérias do grupo *B. cereus* do LDBE baseando-se apenas em características fenotípicas. As características morfológicas e bioquímicas, por si só, não são suficientes para classificar estes microrganismos até ao nível espécie. Seria necessário recorrer a metodologias moleculares para uma melhor classificação destas estirpes.

B. cereus sensu stricto é um microrganismo globalmente conhecido devido à sua capacidade de provocar síndrome diarreica. Crê-se que seja uma patologia sub diagnosticada, tanto em Portugal como em todos os países do mundo, uma vez que é uma doença auto-limitante. No entanto, não se pode negligenciar. Por exemplo, um surto de toxinfecção alimentar por enterotoxinas de *B. cereus*, originando síndrome diarreica, e que afecte um conjunto de militares destacados numa determinada missão, não só compromete o sucesso dessa missão, como também obriga a uma evacuação de emergência, o que, em determinadas situações pode não ser possível.

Associando a elevada incidência de estirpes potencialmente patogénicas à grande capacidade de resistência destes microrganismos através da produção de esporos termorresistentes e, considerando que a dose infectante de *B. cereus* é de 10^5 - 10^8 bactérias e que a maioria das estirpes são mesofílicas, considera-se importante manter os alimentos a temperaturas inferiores a 7°C impedindo assim a germinação dos esporos e o crescimento bacteriano.

Na caracterização bioquímica destes microrganismos verificou-se que algumas estirpes não metabolizavam o amido nem a salicina. Considerando que estas características estão associadas a estirpes de *B. cereus* produtoras de cereulida, seria interessante investigar a presença do gene *ces* nestes isolados. Seria também interessante verificar se, à semelhança das estirpes eméticas, as estirpes potencialmente enterotóxicas apresentavam características bioquímicas semelhantes que pudessem ser um indicador adicional da presença dos genes que codificam as enterotoxinas numa dada estirpe.

A análise de PCR é um método bastante específico, mas só identifica bactérias potencialmente patogénicas, podendo não existir uma correlação positiva com a produção das toxinas. Desta forma, a combinação de métodos moleculares com métodos imunológicos é essencial para ocorrer uma detecção efectiva da presença das enterotoxinas.

Neste trabalho realizou-se a pesquisa dos genes que codificam a enterotoxina hemolítica BL, a enterotoxina não-hemolítica, a citotoxina K e a enterotoxina T. Das 76 estirpes analisadas 28 revelaram-se positivas para a toxina HBL, 27 para a NHE, 43 para a

enterotoxina T e nenhuma estirpe foi positiva para a citotoxina K. Em suma, 58 das 76 estirpes de *B. cereus sensu lato* utilizadas neste trabalho são potencialmente patogênicas. Este estudo permitiu também concluir sobre a grande variabilidade das estirpes de *B. cereus* que são portadoras de genes que codificam as enterotoxinas.

Neste trabalho verificou-se que alimentos como refeições de carne, pratos de pescado, saladas e gelados de leite apresentavam elevada percentagem de estirpes de *B. cereus* potencialmente patogênicas. A presença deste microrganismo nos pratos de peixe pode estar relacionada com os ingredientes que acompanhavam a refeição, nomeadamente legumes e arroz. Nos pratos de carne, os microrganismos podem ter sido veiculados pelas especiarias que entram no tempero dos alimentos, bem como pelo arroz e massas que, neste estudo, aparecem como acompanhamento nas refeições de carne. Como *B. cereus* é um constituinte normal do solo, contaminam com muita facilidade alimentos como alface e tomate que entram na constituição das saladas analisadas neste trabalho. A presença deste microrganismo nos gelados analisados pode estar relacionada com a contaminação do leite, mas as polpas utilizadas no fabrico deste alimento (de morango, baunilha e chocolate) também podem constituir a fonte da contaminação. Em suma, a análise de alimentos constituídos por vários ingredientes torna difícil a associação da presença do microrganismo em estudo com um ingrediente específico, uma vez que, sendo *B. cereus* produtor de esporos, é encontrado numa ampla variedade de alimentos. Em complemento, pode ser realizado um estudo semelhante analisando ingredientes específicos (só arroz, só leite, etc.).

Estes estudos são importantes uma vez que fornecem novas perspectivas sobre a ocorrência e distribuição dos genes que codificam as enterotoxinas em diferentes alimentos, contribuindo também para um melhor conhecimento da epidemiologia de *B. cereus*. Seria necessário um estudo mais detalhado para se poder correlacionar a presença de um determinado gene (que codifica uma enterotoxina) com um alimento, ambiente ou genótipo específico e a produção das enterotoxinas.

VII. Bibliografia

- Opinion of the scientific panel on biological hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs. (2005). *The EFSA Journal*, 175, 1-48.
- The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the european union in 2005. (2006). *The EFSA Journal*, 94.
- The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the european union in 2006. (2007). *The EFSA Journal*, 130.
- Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I., & Isobe, M. (1994). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiology Letters* 121, 32-34.
- Agata, N., Ohta, M., Arakawa, Y., & Mori, M. (1995). The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxigenic protein. *Microbiology*, 141, 983-988.
- Al-Khatib, M. S., Khyami-Horani, H., Badran, E., & Shehabi, A. A. (2007). Incidence and characterization of diarrheal enterotoxins of fecal *Bacillus cereus* isolates associated with diarrhea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59, 383-387.
- Andersson, A., Granum, P. E., & Ronner, U. (1998). The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 93-99.
- Arnesen, L. P. S., Fagerlund, A., & Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Review*, 1-28.
- Asano, S., Nukumizu, Y., Bando, H., Iizuka, T., & Yamamoto, T. (1997). Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Applied and environmental microbiology*, 63(3), 1054-1057.
- Auger, S., Galleron, N., Bidnenko, E., Ehrlich, S. D., Lapidus, A., & Sorokin, A. (2008). The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* group is representative of a cluster of thermophilic strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 1276-1280.
- Baida, G. E., & Kuzmin, N. P. (1995). Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*. *Biochemistry and Biophysics*, 1264, 151-154.
- Baida, G. E., & Kuzmin, N. P. (1996). Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. *Biochemistry and Biophysics*, 1284, 122-124.
- Bartoszewicz, M., Hansen, B. M., & Swiecicka, I. (2008). The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiology*, 25, 588-596.
- Bavykin, S. G., Lysov, Y. P., Zakhariev, V., Kelly, J. J., Jackman, J., Stahl, D. A., et al. (2004). Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and gyrB gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3711-3730.

- Beecher, D. J., & Macmillan, J. D. (1990). A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity*, 58(7), 2220-2227.
- Beecher, D. J., & Macmillan, J. D. (1991). Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity*, 59(5), 1778-1789.
- Beecher, D. J., Pulido, J. S., Barney, N. P., & Wong, A. C. L. (1995). Extracellular virulence factors in *Bacillus cereus* endophthalmitis: methods and implications of involvement of hemolysin BL. *Infection and Immunity*, 63(2), 632-639.
- Beecher, D. J., Schoeni, J. L., & Wong, A. C. L. (1995). Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity*, 63(11), 4423-4428.
- Beecher, D. J., & Wong, A. C. L. (1994). Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor. *Infection and Immunity*, 62(3), 980-986.
- Beecher, D. J., & Wong, A. C. L. (1997). Tripartited hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(1), 233-239.
- Bhunia, A. K. (2007). *Foodborne microbial pathogens - mechanisms and pathogenesis*. West Lafayette: Springer.
- Borge, G. I. A., Skeie, M., Sorhaug, T., Langsrud, T., & Granum, P. E. (2001). Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 237-246.
- Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., Salonen, M. S., et al. (2006). Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Food Microbiology*, 109(2006), 132-138.
- Carlson, C. R., Caugant, D. A., & Kolsto, A.-B. (1994). Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Applied Environmental Microbiology* 60, 1719-1725.
- Chang, Y.-H., Shangkuang, Y.-H., Lin, H.-C., & Liu, H.-W. (2003). PCR assay of the groEL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4502-4510.
- Choma, C., & Granum, P. E. (2002). The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. *FEMS Microbiology Letters*, 217, 115-119.
- Clavel, T., Carlin, F., Dargaignaratz, C., Lairon, D., Nguyen-The, C., & Schmitt, P. (2007). Effects of porcine bile on survival of *Bacillus cereus* vegetative cells and haemolysin BL enterotoxin production in reconstituted human small intestine media. *Journal of Applied Microbiology*, 103(1568-1575).
- Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C., & Schmitt, P. (2004). Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 214-219.
- Cronin, U. P., & Wilkinson, M. G. (2009). The growth, physiology and toxigenic potential of *Bacillus cereus* in cooked rice during storage temperature abuse. *Food Control*, 20, 822-828.

- Dietrich, R., Moravek, M., Burk, C., Granum, P. E., & Martlbauer, E. (2005). Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the *Bacillus cereus* nonhemolytic enterotoxin complex. *Applied and environmental microbiology*, 71(12), 8214-8220.
- Duport, C., Zigha, A., Rosenfeld, E., & Schmitt, P. (2006). Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system. *Journal of Bacteriology*, 188(18), 6640-6651.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., & Scherer. (2004). *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *FEMS microbiology letters*.
- Ehling-Schulz, M., Guinebretière, M.-H., Monthán, A., Berge, O., Fricker, M., & Svensson, B. (2006). Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, 260, 232-240.
- Fagerlund, A., Ween, O., Lund, T., Hardy, S. P., & Granum, P. E. (2004). Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology*, 150, 2689-2697.
- Firth, J. D., Putnins, E. E., Larjava, H., & Uitto, V. J. (1997). Bacterial phospholipase C upregulates matrix metalloproteinase expression by cultured epithelial cells. *Infection and immunology*, 65(12), 4931-4936.
- Fritze, D. (2004). Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*, 94, 1245-1248.
- Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., Ravnum, S., Økstad, O., Gominet, M., et al. (2008). The PlcR Virulence Regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE*, 3(7), 1-9.
- Gohar, M., Økstad, O., Gilois, N., Sanchis, V., & Kolstø, A. (2002). Twodimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics*, 2, 784-791.
- Granum, P. E., & Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letter*, 157, 223-228.
- Granum, P. E., O' Sullivan, K., & Lund, T. (1999). The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters*, 177, 225-229.
- Guinebretière, M.-H., Brousolle, V., & Nguyen-The, C. (2002). Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *Applied Environmental Microbiology*, 40(8), 3053-3056.
- Guinebretière, M.-H., Thompson, F. L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., et al. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environmental Microbiology*, 10(4), 851-865.
- Hansen, B. M., & Hendriksen, N. B. (2001). Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Applied and environmental microbiology*, 67(1), 185-189.
- Hansen, B. M., Hoiby, P. E., Jensen, G. B., & hendriksen, N. B. (2003). The *Bacillus cereus* bceT enterotoxin sequence reappraised. *FEMS Microbiology Letters*, 223, 21-24.
- Hardy, S., Lund, T., & Granum, P. E. (2001). CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS microbiology letters*, 197, 47-51.

- Heinrichs, J. H., Beecher, D. J., Macmillan, J. D., & Zilinskas, B. A. (1993). Molecular cloning and characterization of the hblA gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, 175(21), 6760-6766.
- Helgason, E., Økstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., et al. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*— one species on the basis of genetic evidence. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2627-2630.
- Jääskeläinen, E. (2008). *Assessment and control of Bacillus cereus emetic toxin in food.*, University of Helsinki, Helsinki.
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., & Haapasalo, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*, 2, 189-198.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K. P., PrunO, B. M., Kaplan, T., WieOner-Gunkel, E., et al. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 1373-1382.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., Salameitou, S., & Sanchis, V. (1996). Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *Journal of Bacteriology*, 178, 2749-2756.
- Lindback, T., Fagerlund, A., Rodlandt, M. S., & Granum, P. E. (2004). Characterization of the *Bacillus cereus* nhe enterotoxin. *Microbiology*, 150, 3959-3967.
- Lindback, T., & Granum, P. E. Detection and purification of *Bacillus cereus* enterotoxins. In C. C. Adley (Ed.), *Food-borne Pathogens: Methods and Protocols* (Vol. 21, pp. 15-26). Totowa: Humana Press Inc.
- Lindback, T., Økstad, O. A., Rishovd, A.-L., & Kolstø, A.-B. (1999). Insertional inactivation of hblC encoding the L2 component of *Bacillus cereus* ATCC 14579 haemolysin BL strongly reduces enterotoxigenic activity, but not the haemolytic activity against human erythrocytes. *Microbiology*, 145, 3139-3146.
- Logan, N., & Berkeley, R. (1984). Identification of *Bacillus* Strains Using the API System. *Journal of General Microbiology*, 130, 1871-1882.
- Lund, T., Buyser, M.-L. D., & Granum, P. E. (2000). A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology*, 38(2), 254-261.
- Lund, T., & Granum, P. E. (1996). Characterization of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS microbiology letters*, 141, 151-156.
- Manzano, M., Cocolin, L., Cantoni, C., & Comi, G. (2003). *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 249-254.
- Manzano, M., Giusto, C., Iacumin, L., Cantoni, C., & Comi, G. (2009). Molecular methods to evaluate biodiversity in *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains from different origins. *Food Microbiology*, 26, 259-264.
- Maurer, J. (2006). *PCR methods in foods*. Athens, GA: Springer.

- Minnaard, J., Delfederico, L., Vasseur, V., Hollmann, A., Rolny, I., Semorile, L., et al. (2007). Virulence of *Bacillus cereus*: a multivariate analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 197-206.
- Molva, C., Sudagidan, M., & Okuklu, B. (2009). Extracellular enzyme production and enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated from cheese in Turkey. *Food Control*, 20, 829-834.
- Murrey, P. R., Baren, E. J., Jargensen, J. H., Landry, M. L., & Pfaller, M. A. (2007). *Manual of clinical microbiology* (9^a ed. Vol. 1): ASM Press.
- Nakamura, L. K. (1998). *Bacillus pseudomycoides* sp. nov. *international Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 1031-1035.
- Ngamwongsatit, P., Buasri, W., Pianariyanon, P., Pulsrikarn, C., & Ohta, M. (2008). Broad distribution of enterotoxin genes (hblCDA, nheABC, cytK, and entFM) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 352-356.
- Ouoba, L. I. I., Thorsen, L., & Varnam, A. H. (2008). Enterotoxins and emetic toxins production by *Bacillus cereus* and other species of *Bacillus* isolated from Soumbala and Bikalga, african alkaline fermented food condiments. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 224-230.
- Pielaat, A., Fricker, M., Nauta, M. J., & Leusden, F. M. v. (2005). *Biodiversity in Bacillus cereus*: National Institute for Public Health and Environment.
- Pielaat, A., Wijnands, L. M., Takumi, K., Nauta, M. J., & Van Leusden, F. M. (2006). *The fate of Bacillus cereus in gastro-intestinal tract*: National Institute for Public Health and Environment.
- Prescott, Harley, & Klein's. (2008). *Microbiology* (7^a ed.). Nova Iorque: McGraw Hill
- Priest, F. G., Barker, M., Baillie, L. W. J., Holmes, E. C., & Maiden, M. C. J. (2004). Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *Journal of Bacteriology*, 186, 7959-7970.
- Pruß, B. M., Dietrich, R., Nibler, B., Martlbauer, E., & Scherer, S. (1999). The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Applied and environmental microbiology*, 65(12), 5436-5442.
- Radhika, B., Chandrashekar, A., Keshava, N., & Varadaraj, M. C. (2002). Detection of *Bacillus cereus* in foods by colony hybridization using PCR-generated probe and characterization of isolates for toxins by PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 131-138.
- Radnedge, L., Agron, P. G., Hill, K. K., Jackson, P. J., Ticknor, L. O., Keim, P., et al. (2003). Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Applied and environmental microbiology*, 69(5), 2755-2764.
- Rajkowski, K. T., & Bennett, R. W. (2003). *Bacillus cereus*. In *International handbook of foodborne pathogens*. Nova Iorque: Marcel Dekker, INC.
- Ryan, P. A., Macmillan, J. D., & Zilinskas, B. A. (1997). Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L₁ and L₂ components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, 179(8), 2551-2556.

- Schoeni, J. L., & Wong, A. C. L. (1999). Heterogeneity observed in the components of hemolysin BL, an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 159-167.
- Slamti, L., & Lereclus, D. (2002). A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO Journal*, 21, 4550-4559.
- Svensson, B., Monthán, A., Guinebrière, M.-H., Nguyen-The, C., & Christiansson, A. (2007). Toxin production potencial and the detection of toxin genes among strains of the *Bacillus cereus* group isolated along the dairy production chain. *International Dairy Journal*, 17, 1201-1208.
- Tourasse, N. J., Helgason, E., Okstad, O. A., Hegna, I. K., & Kolstø, A.-B. (2006). The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genomic dynamics. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 579-593.
- Vilas-Bôas, G. T., Peruca, A. P. S., & Arantes, O. M. N. (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 53, 673-687.
- Wijnands, L., Dufrenne, J., & Leusden, F. v. (2002). *Characterization of Bacillus cereus*: National Institute for Public Health and Environment.
- Wijnands, L., Dufrenne, J., & Leusden, F. v. (2002). *The pathogenic mechanism of the diarrheal syndrome caused by Bacillus cereus*: National Institute for Public Health and Environment.
- Wijnands, L., Dufrenne, J., & Leusden, F. v. (2005). *Bacillus cereus: characteristics, behaviour in the gastro-intestinal tract, and interaction with Caco-2 cells*: National Institute for Public Health and Environment.
- Zigha, A., Rosenfeld, E., Schmitt, P., & Duport, C. (2007). The redox regulator Fnr is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73. *Journal of Bacteriology*, 189(7), 2813-2824.

Anexo 1 – Origem das estirpes em estudo

Estirpe	Origem
J4	Arroz doce
J238	Carne de Borrego
J239	Salada de alface, cenoura, tomate e cebola
J240	Corvina no forno com batata cozida
J241	Gelado de morango
J242	Gelado de Chocolate
J243	Bife da vazia cru
J244	Gelado de morango
J245	Salada de alface e cebola
J246	Gelado de chocolate
J247	Gelado de baunilha
J248	Farinha
J249	Farinha
J250	Salada de alface e tomate
J251	Farinha
J252	Farinha
J253	Farinha
J254	Farinha
J255	Bacalhau espiritual
J256	Bacalhau espiritual
J257	Salada mista
J258	Salada mista
J259	Bifinhos com cogumelos
J260	Dourada grelhada com legumes
J262	Dourada grelhada com legumes
J263	Alheira com batata, ovo e grelos salteados
J264	Aveia
J266	Coelho à caçador
J269	Gelado de morango
J270	Gelado de baunilha
J271	Gelado de chocolate
J272	Fiambre fatiado
J273	Esparguete à bolonhesa
J274	Esparguete à bolonhesa
J280	Maruca cozida
J281	Maruca cozida
J285	Gelado de morango
J286	Gelado de baunilha

Estirpe	Origem
J287	Gelado de chocolate
J288	Gelado de morango
J289	Gelado de baunilha
J290	Gelado de chocolate
J293	Bacalhau com todos
J294	Feijoada de chocos
J297	Bacon
J298	Frango à provençal
J299	Pastel de feijão
J300	Salada de atum
J301	Salada de atum
J302	Sandes mista
J303	Chouriço mouro
J304	Bife com batata frite e arroz
J305	Salada de alface, tomate, cenoura e cebola
J306	Peixe gratinado com arroz
J307	Sopa da pedra
J308	Cozido à portuguesa
J309	Dieta para acamados
J310	Farinha tipo 65
J311	Farinha
J312	Aveia
J313	Gelado de morango
J314	Gelado de baunilha
J315	Gelado de chocolate
J316	Gelado de chocolate
J317	Gelado de morango
J318	Gelado de baunilha
J319	Salada de alface para doentes
J320	Bolos
J321	Salada de alface
J322	Bacalhau cozido com grão e ovo
J323	Gelado de morango
J324	Amarelo de carne
J325	Arroz de peixe
J326	Gelado de morango
J327	Gelado de baunilha

Anexo 2 – Alinhamento das sequências nucleotídicas

Gene *hblA*

```

gi | 6759458_13450-14721          CGCTATTAAGTATTACAACTGCTAATGTAGTTTCACCAGTAACAACCTTTT 103
gi | 59896065_3716-4843          CGCTATTAAGTATTACAACTGCTAATGTAGTTTCACCAGTAACAACCTTTT 90
gi | 414299 | gb | L20441.1 | BACHEMLB CGTTATTAAGTATTACAACTGCTAATGTAGTTTCACCTGTAGCAACCTTTT 150
gi | 56789953_2638-3775          CGTTTTTAAGTATTACAACTTCCGTAGTCTCACCAGTAGCGAGCTTTT 103
gi | 56789945_2633-3773          CGTTTTTAAGTATTGACAACAACCTTCTGTAGTCTCACCAGTAGCAGCTTTT 103
gi | 90990799 | emb | AJ937208.1 | CGTTTTTAAGTATTGACAACAACCTTCTGTGTTGTTTCACCAGTAGCAACCTTTT 91
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *

gi | 6759458_13450-14721          GCAAGTGAAATTGAACAAACGAACAATGGAGATACGGCTCTTTCTGCAAAA 153
gi | 59896065_3716-4843          GCAAGTGAAATTGAACAAACGAACAATGGAGATACGGCTCTTTCTGCAAAA 140
gi | 414299 | gb | L20441.1 | BACHEMLB GCAAGTGAAATTGAACAAACGAACAATGGAGATACGGCTCTTTCTGCAAAA 200
gi | 56789953_2638-3775          GCAAGTGAAATTCAACAAACCTAATACTGAAGATT---CTCTTTTCAGCAAAA 150
gi | 56789945_2633-3773          GCAAGTGGAATTGAACAAACCAACAATGGAGATATGTCTCTTTTCAGCAAAA 153
gi | 90990799 | emb | AJ937208.1 | GCAAGTGGAATTGAACAAACCTAACAATGGAGATACGTCTCTTTTCAGCAAAA 141
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *

gi | 6759458_13450-14721          TGAAGCGAGAATGAAAGAGACCTTGCAAAAAGGCTGGATTATTTGCAAAAAT 203
gi | 59896065_3716-4843          TGAAGCGAGAATGAAAGAGACCTTGCAAAAAGGCTGGATTATTTGCAAAAAT 190
gi | 414299 | gb | L20441.1 | BACHEMLB TGAAGCGAGAATGAAAGAACTTTTGCAAAAAGGCTGGATTATTTGCAAAAAT 250
gi | 56789953_2638-3775          TGACGTGAAGATGAAAGAAACCTTGCAAAAAGGCTGGATTATTTGCAAAAAT 200
gi | 56789945_2633-3773          TGAAGTAAAGATGAAAGAAACCTTGAAAAAGGCTGGGTTATTTGCAAAAAT 203
gi | 90990799 | emb | AJ937208.1 | TGAACGGAAGATGAAAGAACTTTTGCAAAAAGGCTGGGTTATTTGCAAAAAT 191
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *

```

Gene *hblC*

```

gi | 56789953_1-1320          GTTACAAAAACGAAAGAGTATGACCTGACGAAAGTTATTGACCTGAAAA 956
gi | 56789949_1-1320          GTTACAAAAACGAAAGAGTATGACCTGACGAAAGTTATTGACCTGAAAA 956
gi | 56789945_1-1320          ATTACAAAGACAAAGAGTATGACCTTACGAAGGTTATTGATCCTGAAAA 956
gi | 56789941_1-1320          GTTGCAAAAAACAAAGAGTATGACCTTACGAAAGTAATTGATCCTGAAAA 956
gi | 59896065_1078-2397       GCAGCAAAAAACACAAGAGTATGACCTGATGAAGGTCATTGATACCGAAAA 956
gi | 1945049_1171-2526       GCAGCAAAAAACACAAGAGTATGACCTGATGAAAGCCATTGATACCGAAAA 968
gi | 6759458_9932-12169       GCAGCAAAAAACACAAGAGTATGACCTGATGAAGGTCATTGATACCGAAAA 1850
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *

gi | 56789953_1-1320          AATTAAAAAACATACAGTGCCCTTCGCTGAGGTAATAAATAAACAGCAG 1006
gi | 56789949_1-1320          AATTAAAAAACATACAGTGCCCTTCGCTGAGGTAATAAATAAACAGCAG 1006
gi | 56789945_1-1320          AATTAAAAAACATACAGTGCCCTTCGCTGAGGTAATAAATAAACAGCAG 1006
gi | 56789941_1-1320          AATTAAAAAACATATAGTGCTTTTCGCTGAGGTAATAAATAAACAGCAG 1006
gi | 59896065_1078-2397       GATTAAGAAAAACATTTGGCGTTTTTTCGCTGAAGTAATAAATAAACAGCAG 1006
gi | 1945049_1171-2526       GATTAAGAAAAACATTTGGCGTTTTTTCGCTGAAGTAATAAATAAACAGCAG 1018
gi | 6759458_9932-12169       GATTAAGAAAAACATTTGGCGTTTTTTCGCTGAAGTAATAAATAAACAGCAG 1900
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *

gi | 56789953_1-1320          AGCAACGAGCACATTTAGCTGATTTAGAGGTACAAAACCAAAAATTTTAT 1056
gi | 56789949_1-1320          AGCAACGAGCACATTTAGCTGATTTAGAGGTACAAAACCAAAAATTTTAT 1056
gi | 56789945_1-1320          AGCAACGAGCACATTTAGATGATTTAGAGAAGCAAAAACCAAAAATTTTAT 1056
gi | 56789941_1-1320          AACAGCGAACACATTTAGCAGATTTAGAGACACAAAACCAAAAATTTTAT 1056
gi | 59896065_1078-2397       AACAGCGAGCATATTTAGATGATTTAGAGAAACAAAATCAAAAATATAT 1056
gi | 1945049_1171-2526       AACAGCGAGCATATTTAGATGATTTAGAGAAACAAAATCAAAAATATAT 1068
gi | 6759458_9932-12169       AACAGCGAGCATATTTAGATGATTTAGAGAAACAAAATCAAAAATATAT 1950
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *

gi | 56789953_1-1320          GATTTAACAAAGAACTTAGCAGTAGCAGATTTACAAAAATCTATGCTTCT 1106
gi | 56789949_1-1320          GATTTAACAAAGAACCTAACAGTAGCAGATTTACAAAAATCTATGCTTCT 1106
gi | 56789945_1-1320          GATTTAACAAAGAACCTAACAGTAGCAGATTTACAAAAATCTATGCTTCT 1106
gi | 56789941_1-1320          GATTTAACTAAGAACCTAAAAATAGCAGATTTACAAAAATCAATGCTTCT 1106
gi | 59896065_1078-2397       GATTTAACAAACGAAATTATCAATAGCTGATTTACAAAAATCAATGCTTCT 1106
gi | 1945049_1171-2526       GATTTAACAAACGAAATTATCAATAGCTGATTTACAAAAATCAATGCTTCT 1118
gi | 6759458_9932-12169       GATTTAACAAACGAAATTATCAATAGCTGATTTACAAAAATCAATGCTTCT 2000
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *
                                     * * * * *

```

Gene *hblD*

gi 59896065_2459-3679	AAATTCAAAGAAGTTACAGATGTGATTAAGATGCTACAAGACTTCAAAG	538
gi 6759458_12194-13426	AAATTCAAAGAAGTTACAGATGTGATTAAGATGCTACAAGACTTCAAAG	550
gi 1945049_2552-3717	AAATTCAAAGAAGTTACAGATGTGATTAAGATGCTACAAGACTTCAAAG	549
gi 90990775 emb AJ937196.1	AAATTCAAAGAAGGTTACAGATGTAATTAAGATGCTACAAGACTTCAAAG	439
gi 90990773 emb AJ937195.1	AAATTCAAAGAAGGTTACAGATGTAATTAAGATGCTACAAGACTTCAAAG	439
gi 56789941_1375-2606	AAATTCAAAGAAGGTTACAGAAGTAATTAAGATGTTACAGGACTTCAAAA	549
gi 56789953_1380-2620	AAATTCAAAGAAGTTACAGAAGTAATTAAGATGTTACAGAAGACTTCAAAG	549
gi 56789949_1380-2620	AAATTCAAAGAAGTTACAGAAGTAATTAAGATGCTACAAGACTTCAAAG	549
gi 56789945_1378-2609	AAATTCAAAGAAGGTTACTGAAGTAATTAAGATGCTAGAAGCCTTCAAAG	549
	***** ** * * *	
gi 59896065_2459-3679	GGAAACTATATCAAAATTTCTACAGATTTTAAAAATAATGTTGGTGGTCCA	588
gi 6759458_12194-13426	GGAAACTATATCAAAATTTCTACAGATTTTAAAAATAATGTTGGTGGTCCA	600
gi 1945049_2552-3717	GGAAACTATATCAAAATTTCTACAGATTTTAAAAATAATGTTGGTGGTCCA	599
gi 90990775 emb AJ937196.1	GGAAACTATATCAAAATTTCTACAGATTTTAAAAATAATGTTGGTGGTCCA	489
gi 90990773 emb AJ937195.1	GGAAACTATATCAAAATTTCTACAGATTTTAAAAATAATGTTGGTGGTCCA	489
gi 56789941_1375-2606	CAAAACTATATGACAAATTTCTACAGATTTTAAAAATAATGTTAGGCGGCCAA	599
gi 56789953_1380-2620	CAAAACTGTATGACAAATTTCTACAGGTTTAAAAATAATGTTGGTGGCCCA	599
gi 56789949_1380-2620	CAAAACTGTATGACAAATTTCTACAGGTTTAAAAATAATGTTGGTGGCCCA	599
gi 56789945_1378-2609	CAAAACTGTACAAATACTACTGATTTTAAAAATAATGTTGGTGGTCCA	599
	**** * * * * *	
gi 59896065_2459-3679	GATGGGAAAGGTGGATTAAGTGAATATTAGCAGGTCAACAGGCAACGAT	638
gi 6759458_12194-13426	GATGGGAAAGGTGGATTAAGTGAATATTAGCAGGTCAACAGGCAACGAT	650
gi 1945049_2552-3717	GATGGGAAAGGTGGATTAAGTGAATATTAGCAGGTCAACAGGCAACGAT	649
gi 90990775 emb AJ937196.1	GATGGGAAAGGTGGATTAAGTGAATATTAGCAGGTCAACAGGCAACGAT	539
gi 90990773 emb AJ937195.1	GATGGGAAAGGTGGATTAAGTGAATATTAGCAGGTCAACAGGCAACGAT	539
gi 56789941_1375-2606	GATGGGAAAGGTGGATTAACCGGCACTATTAGCGGGCAACAGCGCTAAT	649
gi 56789953_1380-2620	GATGGACAAGGTGGATTAACCGGCACTATTAGCGGAAATAATGCCCTAAT	649
gi 56789949_1380-2620	GATGGACAAGGTGGATTAACCGGCACTATTAGCGGAAATAATGCCCTAAT	649
gi 56789945_1378-2609	GATGGGAAAGGTGGCTTAACCGCAATATTAGCAGGAAACAAGCACTGAT	649
	***** * * * *	

Gene *nheA*

gi 90990687 emb AJ937152.1	ATTTAATAGCTATTATAGTAAGCTTTATGAACTAGCAGGGAACGTAATG	90
gi 90990685 emb AJ937151.1	ATTTAATAGCTATTATAGTAAGCTCTATGAACTAGCAGGGAACGTAATG	190
gi 90990689 emb AJ937153.1	ATTTAATAGTTATTATAGTAAGCTCTATGAACTAGCAGGAAACATAAATG	190
gi 73747100_873-2033	ATTTAATAGTTATTACAGTAAGCTCTATGAACTAGCAGGAAACATAAATG	400
gi 62867026_589-1749	ATTCAATAGTTATTATAGTAAGCTCTATGAACTAGCAGGAAATGTAATG	400
gi 71833831_861-2021	ATTTAATAGCTATTATAGTAAGCTCTATGAACTAGCAGGAAACGTAATG	400
gi 114152698_891-2054	GTTTAATAGCTATTACAAACAAATATATGGATTAGCGGAAAAATAAATG	400
gi 114152693_866-2029	GTTTAATAGCTATTACAAACAAATATATGGATTAGCGGAAAAATAAATG	400
	* * * * *	
gi 90990687 emb AJ937152.1	AGGATGAACAAGCAAAAGCAGATTTTACAAATGCATATGGAAAATTACAA	140
gi 90990685 emb AJ937151.1	AAGATGGACAAGCAAAAGCAGATTTTACAGGTGCATATGGAAAATTACAA	240
gi 90990689 emb AJ937153.1	AAGATGAACAAGCAAAAGCAGATTTTACAAATGCATATGGAAAATTACAA	240
gi 73747100_873-2033	AAGATGAACAATCAAAAGCAGATTTTACAAATGCATATGGAAAATTACAA	450
gi 62867026_589-1749	AAGATCAGCAAGCAAAACAGATTTTATGAGTGCATATGGAAAATTACAA	450
gi 71833831_861-2021	AAGATCAGCAAGCAAAAGCAGATCTTATGAGTGCATATGGAAAATTACAA	450
gi 114152698_891-2054	AGGATGAACAAGCAGCGTTCGATTTTACAAATGCCTATGGAAAATTACAA	450
gi 114152693_866-2029	AGGATGAACAAGCAGCGTTCGATTTTACAAATGCCTATGGAAAATTACAA	450
	* * * * *	
gi 90990687 emb AJ937152.1	TTGCAAGTACAAAGCATCCAAGAGAGTATGGAGCAAGATTTATTAGAGTT	190
gi 90990685 emb AJ937151.1	TTGCAAGTACAAAGCATCCAAGAGAGTATGGAGCAAGATTTATTAGAGCT	290
gi 90990689 emb AJ937153.1	TTGCAAGTACAAAGCATCCAAGAGAGTATGGAGCAAGACTTATTAGAGTT	290
gi 73747100_873-2033	TTGCAAGTACAAAGCATCCAAGAGATATGGAGCAAGATTTATTAGAGTT	500
gi 62867026_589-1749	TTGCAAGTACAGAGCATCCAAGAGAGTATGGAGCAAGATTTATTAGAGTT	500
gi 71833831_861-2021	TTGCAAGTACAGAGCATCCAAGAGAGTATGGAGCAAGATTTATTAGAGTT	500
gi 114152698_891-2054	GGGCAGGTACAAATGATTTCAGGATAATATGGAACAAACATTGTTTGAAGTT	500
gi 114152693_866-2029	GGGCAGGTACAAATGATTTCAGGATAATATGGAACAAACATTGTTTGAAGTT	500
	*** * * * *	

Gene *nheB*

```

gi | 62867026_1787-2995      AGGTTCAAATGCTTTAGTAATGGATCTGTATGCTTTAACAATTATTAAAC 250
gi | 73747100_2065-3273      AGGTTCAAACGCTTTAGTAATGGATCTGTACGCTTTAACAATTATTAAAC 250
gi | 71833831_2059-3267      AGGTTCAAATGCTTTAGTAATGGATCTGTACGCTTTAACAATTATTAAAC 250
gi | 114152698_2094-3299      TGGTTCGAATGCTTTAGTAATGGATTTATATGCTTTAACAATAATAAAAC 247
gi | 114152693_2069-3274      TGGTTCGAATGCTTTAGTAATGGATTTATATGCTTTAACAATAATAAAAC 247
                                *****
                                * * * * *

gi | 62867026_1787-2995      AAGGTAATGTAACTTTGGAAATGTATCGACTGTTGATGCGGCTTTAAAA 300
gi | 73747100_2065-3273      AAGGTAATGTAACTTTGGAAATGTATCATCTGTTGATGCGGCTTTAAAA 300
gi | 71833831_2059-3267      AAGGTAATGTAACTTTGGAAATGTATCGTCTGTTGATGCGGCTTTAAAA 300
gi | 114152698_2094-3299      AAGGAAATGTAGTTTTGGAAATGTAACAACGGTTGATGCTCCTTTAAGG 297
gi | 114152693_2069-3274      AAGGAAATGTAGTTTTGGAAATGTAACAACGGTTGATGCTCCTTTAAGG 297
                                *****
                                * * * * *

gi | 62867026_1787-2995      GGAAAAGTGATTGAGCACCACAGATACAGCTAGAGGAAATGCGAAGCAATG 350
gi | 73747100_2065-3273      GGGAAAAGTGATTGAGCACCAGGATACAGCTAGAGGAAATGCGAAGCAATG 350
gi | 71833831_2059-3267      GGGAAAAGTAATTGAGCACCACAGATACAGCTAGAGGAAATGCGAAGCAATG 350
gi | 114152698_2094-3299      GCAAAAATTGTGAGCACCACAAATACAGCGCGAAGTAATGCAAAACAATG 347
gi | 114152693_2069-3274      GCAAAAATTGTGAGCACCACAAATACAGCGCGAAGTAATGCAAAACAATG 347
                                * * * * *

```

Gene *nheC*

```

gi | 62867026_3103-4182      TTCATATGCAAAATTAATTCAAAATCAACAAGAGACGGATTTAAGTAAAA 250
gi | 71833831_3375-4454      TTCATATGCAAAATTAATTCAAAATCAACAAGAGACGGATTTAAGTAAAA 250
gi | 73747100_3381-4460      TTCATATGCAAAATTAATTCAAAATCAGCAAGAAACGGATTTAAGCAAAA 250
gi | 114152698_3368-4429      TTCATATGCAAAATTAATTCTTGATCAACAAGAAACAGATTTACATAAGA 232
gi | 114152693_3343-4404      TTCATATGCAAAATTAATTCTTGATCAACAAGAAACAGATTTACATAAGA 232
                                *****
                                * * * * *

gi | 62867026_3103-4182      TAAGTTCGATTAATAGTGAATTTAAAGGGAATATGATTGAGCCTCAAAGA 300
gi | 71833831_3375-4454      TAAGTTCGATTAATAGTGAATTTAAAGGGAATATGATTGAGCATCAAAGA 300
gi | 73747100_3381-4460      TAAGTTCGATTAATGGTGAGCTTAAAGGGAATATGATTGAGCATCAAAGA 300
gi | 114152698_3368-4429      TAAACTCCATTACCGGTGATGTAAGACGAGATATAATCCAACATCAAAGA 282
gi | 114152693_3343-4404      TAAACTCCATTACCGGTGATGTAAGACGAGATATAATCCAACATCAAAGA 282
                                *** * * * *

gi | 62867026_3103-4182      GATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAAGCCTCAAAT 350
gi | 71833831_3375-4454      GATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAAGCCTCAAAT 350
gi | 73747100_3381-4460      GATGCAAAAATGAATGCGGCGTATTGGTTAAATAGTATGAAGCCTCAAAT 350
gi | 114152698_3368-4429      GATGCAAAAATGAATGCAACAATTTGGACCCATCAAATGAAACCACAAAT 332
gi | 114152693_3343-4404      GATGCAAAAATGAATGCAACAATTTGGATCCATCAAATGAAACCACAAAT 332
                                *****
                                * * * * *

```